

Universität Zürich

Zentrum für Zahnmedizin

Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

UniversitätsSpital Zürich

Institut für Klinische Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. H. Moch

---

Arbeit unter Leitung von PD Dr. med. M. Tinguely und Dr. med. T. Reineke

**Regulatorische T-Zellen in post-transplantären lymphoproliferativen  
Erkrankungen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von

**Valbona Halili**

**von Bilten GL**

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus W. Grätz

Zürich 2013

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Glossar.....	V
Zusammenfassung.....	VI
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Epidemiologie .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Ätiopathogenese der PTLD .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 EBV und PTLD .....	10
<b>1.3 Klinik der PTLD .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Diagnostik der PTLD .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Konventionelle Therapie und Immuntherapie .....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Immuntherapeutische Ansätze .....	12
<b>1.6 Regulatorische T-Zellen (Tregs) und ihre Funktionen .....</b>	<b>13</b>
1.6.1 Identifizierung der Tregs .....	15
1.6.2 FOXP3 .....	16
1.6.3 CD3 .....	17
<b>1.7 Zielstellung.....</b>	<b>18</b>
<b>2 PatientInnen und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Patienten, Material, Datenquellen .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Tissue microarray (TMA) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Immunhistochemie (IHC) .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Visuelle Schätzung am Bildschirm vs. Auswertung mittels Computer     unterstützter Signal-Markierung .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Epidemiologie und statistische Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Resultate .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Rezidivpatienten .....	30
<b>3.2 Statistische Erhebungen .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Welche Untersuchungsmethode ist besser? .....	31
3.2.2 Bland-Altman-Plots für PTLD alleine und PTLD im Vergleich zur Kontroll- gruppe CLL.....	32

3.2.3 Vergleich von FOXP3 und CD3 in zwei untersuchten Krankheits-Gruppen (PTLD vs. CLL) .....	34
3.2.4 Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von verschiedenen Variablen, mit Angaben des p-Wertes.....	37
3.2.5 Korrelation der untersuchten Variablen mit dem Überleben.....	39
<b>4 Diskussion. ....</b>	<b>41</b>
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>44</b>
<b>6 Danksagung.....</b>	<b>47</b>
<b>7 Lebenslauf.....</b>	<b>49</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Organabhängige 5 Jahresinzidenz der PTLD.....	9
Abb. 2 Natürliche und induzierte Tregs.....	13
Abb. 3 Effekte immunsuppressiver Medikamente auf Tregs.....	17
Abb. 4 Herstellung eines Tissue microarrays.....	20
Abb. 5 PTLD- und CLL-Spots .....	22
Abb. 6 Alter zum Zeitpunkt der Transplantation.....	26
Abb. 7 Geschlecht, Verlauf und Überleben.....	26
Abb. 8 Diagnose und Biopsie des von PTLD betroffenen Organs .....	27
Abb. 9 Transplantat und Onset .....	27
Abb. 10 Klonalität, EBV-Status und Latenztyp.....	28
Abb. 11 Rezidivpatienten .....	30
Abb. 12 Bland-Altman-Plots in PTLD und CLL .....	32
Abb. 13 Boxplots: FOXP3 und CD3 in PTLD .....	34
Abb. 14 Boxplots: FOXP3 und CD3 in PTLD und CLL .....	35
Abb. 15 Überlebens-Analysen nach Kaplan-Meier .....	38
Abb. 16 Boxplots: CD3 in Abhängigkeit von der Immunsuppression.....	40
Abb. 17 Abhängigkeit des prozentualen Anteils von FOXP3 auf das Überleben.....	40

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Risikofaktoren für PTLD .....	9
Tab. 2 Wesentliche Unterschiede der PTLD nach HSZT und SOT .....	10
Tab. 3 Malignität in Abhängigkeit des viralen Genoms .....	11
Tab. 4 Effekt immunsuppressiver Medikamente auf Tregs.....	15
Tab. 5 Antikörper-Datenbank .....	21
Tab. 6 Zusammenstellung der wichtigsten Daten der PTLD-Gruppe .....	29
Tab. 7 Deskriptive Statistik: 32 PTLD und 5 durch Medikamente induzierte PTLD .....	33
Tab. 8 Deskriptive Statistik: 32 PTLD Patienten .....	34
Tab. 9 Erklärung der Abkürzungen in den Kaplan-Meier-Diagrammen .....	37
Tab. 10 Cox-Regression.....	39
Tab. 11 T-Test und ANOVA .....	39

## **Glossar**

<b>PTLD</b>	Post-transplant lymphoproliferative disorders
<b>CLL</b>	Chronische lymphatische Leukämie
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>HSZT</b>	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
<b>SOT</b>	Solide Organ Transplantation
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>TMA</b>	Tissue microarray
<b>CD3</b>	Cluster of differentiation 3
<b>CSA</b>	Cyclosporin A
<b>FOXP3</b>	Forkhead box P3
<b>Treg</b>	regulatorische T-Zelle
<b>IQR</b>	Interquartilbereich
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>95% VI</b>	95% Vertrauensintervall
<b>LoA</b>	Limits of agreement
<b>Ln</b>	Logarithmus
<b>HR</b>	Hazard Ratio
<b>WHO</b>	World Health Organization

## **Zusammenfassung**

### **Hintergrund**

Die posttransplantäre lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) ist eine heterogene Proliferation von Zellen lymphatischen oder plasmazellulären Ursprungs die sich in einem Spektrum von reaktiven Proliferaten bis hin zu manifesten, malignen Tumoren (Lymphomen) bewegen. Sie können nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) oder im Anschluss an die Transplantation solider Organe (SOT) als Folge der Immunsuppression auftreten. Sie führt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität in dieser Patientengruppe <sup>1</sup> So beträgt die Mortalität von soliden Organ Transplantatempfängern mit PTLD 60%.<sup>2</sup>

PTLD ist nach dem Kaposi-Sarkom und anderen Hautkrebserkrankungen die zweithäufigste tumorartige Erkrankung nach einer Stammzell- bzw. Organtransplantation. In einem grossen Prozentsatz der Fälle ist bei der PTLD das Epstein-Barr-Virus (EBV) ursächlich beteiligt. In den letzten Jahren wurden auch 10 Jahre oder später nach einer Transplantation zunehmend EBV negative PTLD beobachtet. Da die Modulation des Immunsystems im Transplantatempfänger sowohl für die PTLD Entstehung als auch für deren Therapie eine wesentliche Rolle spielt, war es das Bestreben der Studie, Zielstrukturen der Immunsuppression, T-Lymphozyten in PTLD zu untersuchen.

### **PatientInnen und Methoden**

Unsere retrospektive Studie umfasst 37 Patienten aus dem Institut für klinische Pathologie des UniversitätsSpitals Zürich. Hiervon liegt bei 32 Patienten die Diagnose PTLD vor, 31 Patienten erhielten eine solide Organ-, und 1 Patient eine Knochenmarktransplantation. Ausserdem haben wir 5 Patienten in eine Kontrollgruppe eingeschlossen, welche eine primäre (angeborene) oder sekundäre (erworbene), durch Medikamenten induzierte Immundefizienz aufweisen. Patientendaten wie Alter, Geschlecht, Art des Transplantats, Zeitpunkt des Auftretens der PTLD nach Transplantation, sowie die Klassifizierung der PTLD wurden erfasst. Die Diagnosen der ausgewählten Biopsien wurden morphologisch und mittels Immunhistochemie (IHC) auf ihre Richtigkeit überprüft. Aus der Instituts-internen Datenbank PathoPro (Saarbrücken, Deutschland) wurden Patienten mit der Diagnose einer PTLD aus den Jahren 1996-2008 extrahiert. Danach wurden die Fälle histologisiert, wobei sie auf Übereinstimmung der Diagnose gemäss der aktuellen WHO-Klassifikation 2008<sup>3</sup> überprüft wurden. Danach führte man die Biopsien der Spenderblöcke der Gewebechip-Technik (TMA) zu. Die Patientendaten wurden anonymisiert verarbeitet. Es wurden zwei verschiedene T-Zellmarker ausgewertet: FOXP3 und CD3. Die Auswertung erfolgte einerseits durch eine visuelle Schätzung und andererseits mittels eines computerbasierten Auswertungssystem-Programms.

## **Zielstellung**

Retrospektiv soll an unserem Patientenkollektiv mittels Immunhistochemie (IHC) auf Tissue microarrays (TMA), 1) die Prävalenz von zwei Proteinen, FOXP3 und CD3, in regulatorischen T-Zellen, und 2) ihre prognostische Relevanz in PTLD ermittelt werden. Es soll gezeigt werden, ob eine Assoziation zwischen FOXP3 bzw. CD3 und der Diagnose, dem EBV Latenztyp, dem Überleben und der Art der immunsuppressiven Therapie besteht. Ferner soll bestimmt werden, ob ein statistischer Unterschied zwischen PTLD und der Kontrollgruppe mit chronisch lymphozytischem Lymphom von B-Lymphozyten (CLL) in Bezug auf FOXP3 bzw. CD3 besteht.

## **Resultate**

Das mittlere Alter unseres Patientenkollektivs betrug zum Zeitpunkt der Transplantation 43.5 Jahre. Bei 56% der Patienten (18/32) lag eine monomorphe PTLD, bei 6.25 % der Patienten (2/32) ein monomorphes klassisches Hodgkin Lymphom und bei 34% der Patienten (11/32) eine polymorphe PTLD vor. Die mittlere Zeitspanne von der Transplantation bis zur Diagnose PTLD betrug 4.8 Jahre (min: 2 Monate; max: 16.8 Jahre). Zusätzlich haben wir 5 durch Medikamente induzierte PTLD-ähnliche Erkrankungen ausgewertet. Sowohl FOXP3 als auch CD3 waren bei den PTLD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (CLL) erhöht. Es scheint, dass Patienten mit einer erhöhten Anzahl an FOXP3 eine kleinere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, als jene mit einer geringeren Anzahl an FOXP3.

## **Diskussion**

Wir konnten trotz geringer Anzahl PTLD-Fälle mehrere Beobachtungen festhalten, die zumindest in der Literatur so noch nicht beschrieben sind. So wiesen die meisten Patienten ein EBV-positives PTLD auf, mit überwiegend einem Late Onset und erwartungsgemäss einem Latenztyp III und IV. Der Gehalt der untersuchten T-Zellpopulationen in der Kontrollgruppe (CLL) war im Vergleich zur PTLD-Gruppe geringer. Ein möglicher Grund ist die homogenere Tumorphilpopulation in CLL. Der zweite Grund ist der hohe Anteil an EBV-positiven Patienten in der PTLD-Gruppe, welche eine T-Zellaktivierung und möglicherweise eine höhere Anzahl an Tregs herbeiführte. Inwiefern die zur Vermeidung von Abstossungen eingesetzten immunsuppressiven Medikamente, welche bei CLL Patienten nicht zum Einsatz gelangen, eine Rolle spielen ist schwierig zu beurteilen. Weiter zeigten die zahlreichen untersuchten Variablen keine statistisch signifikanten Überlebensvorteile bis auf das Alter in Abhängigkeit von FOXP3 und CD3. Weiter konnten wir beobachten, dass selbst Patienten mit mehreren PTLD Rezidiven inklusive ZNS-Befall eine langjährige Überlebenschance aufweisen. Zusätzliche Untersuchungen von mehreren T-Zellsubpopulationen an grösseren Patientenkollektiven dürften weitere Erkenntnisse zur Mikroumgebung der PTLD liefern.



# **1 Einleitung**

Die post-transplantäre lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) ist eine seltene Komplikation bei Transplantatempfängern. Sie stellt eine sehr heterogene Erkrankung dar und wird in drei grosse Kategorien lymphoproliferativer Erkrankungen unterteilt: Frühe Läsionen, polymorphe und monomorphe PTLD.

Diese Unterteilung reflektiert das morphologische und klonale Spektrum, welches EBV-getriggerte, polyklonale Lymphoproliferationen vom Typ der Mononukleose bis hin zu malignen monoklonalen B-Zell- und selten T-Zell-Lymphomen, die auch bei immunkompetenten Personen auftreten, umfasst.

Die Mehrheit von monomorphen PTLD-Fällen stellen B-Zell Non-Hodgkin Lymphome dar, jedoch kann der Ursprung in seltenen Fällen auch in den T-Zellen liegen.<sup>4</sup> Die B-Zell-Proliferation wird oft durch eine Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus induziert, welches beim Immunkompetenten Individuum im Latenzstadium verbleibt und erst durch eine verminderte Immunlage reaktiviert wird.<sup>5</sup>

Die Inzidenz von PTLD ist abhängig von: 1) Typ des Transplantats, und der davon abhängigen 2) Art der Immunsuppression, 3) Alter des Patienten und 4) dem EBV Serostatus von Spender und Empfänger. Die meisten PTLD-Fälle entwickeln sich in den ersten Jahren nach der Transplantation.

## **1.1 Epidemiologie**

Die Zeit von der Transplantation bis zur Diagnose von PTLD sowie die Charakteristiken von PTLD scheinen vor allem abhängig von der Patientenpopulation, dem Transplantattyp, der immunsuppressiven Behandlung und dem betreffenden Organsystem zu sein.<sup>6</sup> Nach wie vor stehen B-Zellproliferationen im Vordergrund, seltener treten aber auch T-Zellproliferationen und klassische Hodgkin-Lymphome auf. Generell stellen frühe PTLDs (sogenannte Early Onset = <1 Jahr nach Transplantation) eher EBV-positive B-Zell Proliferationen, während später auftretende (sogenannte Late Onsets = > 1 Jahr nach Transplantation) PTLDs eher EBV-negative B-Zell Proliferationen darstellen. Studien mit einer überwiegend erwachsenen Population zeigen eine längere Zeitspanne bis zum Auftreten einer PTLD (25 - 72 Monate) während Studien mit signifikant pädiatrischer Population ein kürzeres Zeitfenster aufweisen (5.5 – 25 Monate).<sup>6</sup>

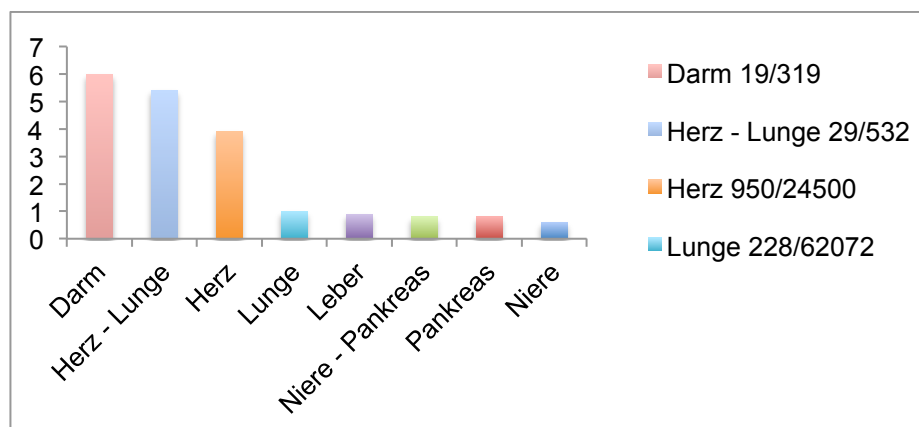
In der Literatur wurden zahlreiche Risikofaktoren (Tab. 1) für PTLD aufgezeigt. Sie können in 5 Gruppen eingeteilt werden<sup>6</sup>:

**Tab. 1 Risikofaktoren für PTLD**

Risikofaktoren
Infektionen. v.a. EBV induzierte Infektionen
Immunlage des Empfängers (junge Kinder/alte Menschen)
Grunderkrankung
Art des Transplantates
Art der Immunsuppression

Zum grössten Risikofaktor für EBV-getriggerte PTLD ist ein seronegativer EBV-Status des Empfängers zur Zeit der Transplantation bei einem EBV-seropositiven Spender. Wichtig zu erwähnen ist, dass 90% gesunder Individuen der Schweizer Bevölkerung IgG seropositiv für eine durchgemachte EBV Infektion sind.

In Abhängigkeit vom transplantierten Organ variiert die Intensität der immunsuppressiven Behandlung und somit das Risiko, PTLD zu entwickeln. Nierentransplantate haben das geringste Risiko (<1%, Kinder: 1-3%), Lebertransplantate weisen ein mittleres Risiko (1-2%, Kinder: 6%) und nach Herz-/Lungen-, bzw. Lungen-/Darmtransplantation (Abb.1) hat man das grösste Risiko an PTLD zu erkranken (5% und mehr, Kinder: bis zu 10%).<sup>6</sup> Bei Kindern ist die höhere Inzidenz an PTLD zu erkranken in den meisten Fällen mit einer primären, post-transplantären EBV-Infektion assoziiert.



**Abb. 1 modifiziert nach Dharnidharka: Kumulative 5 Jahresinzidenz der PTLD in Abhängigkeit des transplantierten Organs**

## 1.2 Ätiopathogenese der PTLD

PTLD können nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) oder im Anschluss an die Transplantation solider Organe (SOT) auftreten (Tab. 2). Nach SOT stellt die PTLD eine vergleichsweise häufige Komplikation dar, die das Langzeitüberleben der Transplantatempfänger beeinträchtigt. PTLD nach HSZT und SOT unterscheiden sich grundsätzlich in Bezug auf die Pathogenese, das klinische Bild, den histologischen Befund, die Therapie und den Verlauf. Die kumulative Inzidenz der PTLD nach HSZT beträgt maximal 1%.<sup>7</sup> In unserer Studie haben wir lediglich einen Fall mit HSZT, weshalb wir in Folge nicht detaillierter auf diese eingehen werden.

**Tab. 2 modifiziert nach Hiddemann: Wesentliche Unterschiede der PTLD nach HSZT und SOT**

	HSZT	SOT
<b>Pathogenese</b>	PTLD geht von <i>Spenderlymphozyten</i> aus, entsteht v.a. innerhalb des ersten Jahres	PTLD geht von <i>Empfängerlymphozyten</i> aus, entsteht in 50% innerhalb des ersten Jahres sowie in etwa 50% bis zu 10 Jahre später (bedingt durch anhaltende Immunsuppression )
<b>Klinische Manifestation</b>	Nodal	Extranodal, v.a. Gastrointestinaltrakt, Lunge, Leber, Niere, ZNS, Transplantat
<b>Verlauf</b>	Häufig aggressiv, rapid letal	Weites Spektrum, von asymptomatischem Zufallsbefund bis extrem aggressiv verlaufend
<b>Histologischer Befund</b>	Keine frühen Läsionen, kein polymorpher Typ, häufiger T-Zell-Lymphom	Häufig frühe Läsionen, polymorpher oder monomorpher Typ, selten T-Zell-Lymphom
<b>Therapie</b>	Meist nicht erfolgreich therapierbar	In der Regel erfolgreich therapierbar

### 1.2.1 EBV und PTLD

EBV ist ein sehr erfolgreiches Virus, welches effektive Strategien entwickelt hat, um ohne ausgeprägte Symptomatik in B-Gedächtniszellen von gesunden Individuen zu persistieren. Die Unterbrechung dieses Gleichgewichts zwischen EBV und antiviraler Immunität, wie zum

Beispiel durch eine bei Organtransplantationen therapeutisch induzierten Immunsuppression zur Verhinderung der Abstossung, kann zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen führen.<sup>8</sup> Zusätzlich zur Immunsuppression spielt auch die Immunlage des Transplantatempfängers in der Entstehung von EBV-assoziierten PTLDs eine Rolle. So sind hier vor allem Kinder und ältere Patienten mit einer „immune senescence“ einem erhöhten Risiko ausgesetzt. Zusammengefasst dringt das EBV in den normalen B-Zell-Differenzierungsprozess ein und persistiert dann in den B-Gedächtniszellen von gesunden Individuen. Bei immunsupprimierten Individuen kann eine Reaktivierung von EBV in den Gedächtniszellen dazu führen, dass das EBV den B-Zelldifferenzierungsprozess übernimmt (Tab. 3), und so zur Entstehung von EBV-positiven B-Zell-Lymphomen führt.<sup>9</sup> Dabei werden virale Gene des Latenzstadiums III oder dem lytischen Stadium in den Wirtszellen exprimiert.

**Tab. 3 modifiziert nach Dharnidharka et al. Malignität in Abhängigkeit des viralen Genoms**

Latenz- typ	Virales Genom	Malignität
I	EBER, (EBNA1)	Burkitt-Lymphome
II	EBNA1,LMP1,LMP2,EBER	Hodgkin-Lymphome,NPC
III	EBNA1,EBNA2,EBNA3S,EBNA-LP,LMP1,LMP2A,LMP2B,1LMP2B,EBER	PTLD, AIDS-related-Lymphome

### 1.3 Klinik der PTLD

Durch die Heterogenität der PTLDs ist eine Verallgemeinerung der Symptome problematisch. Es sind vor allem zwei Erscheinungsformen von PTLD zu unterscheiden: Early- und Late Onset.

Bei den Early Onset (Diagnose PTLD <12 Monate nach Transplantation) kommt es zu einer raschen Vergrößerung des lymphoretikulären Gewebes. Die Krankheit verläuft schnell progredient und die Patienten können sogar das Bild einer systemischen Sepsis präsentieren. Dennoch ist es schwierig, die richtige Diagnose zu stellen, da die Patienten häufig an einem Multiorganversagen leiden. Die Patienten weisen oft grippeähnliche Symptome auf, da Early Onset PTLDs meist EBV assoziiert sind, was eine Unterscheidung zwischen einer PTLD und einem viralen Infekt erschwert.

Die Late Onset (Diagnose PTLD >12 Monate nach Transplantation) ist leichter zu definieren als die Early Onset, da weniger systemische Symptome auftreten und die Krankheit weniger rasch progredient ist als beim Early Onset. Im Befund tritt häufig die B-Symptomatik mit

Fieber, Nachtschweiss und Gewichtsverlust auf, geschwollene Lymphknoten, Halsschmerzen, Unwohlsein, Abdominalschmerzen, Kurzatmigkeit und Kopfschmerzen sind Symptome die ebenfalls auftreten können.<sup>11</sup> Das Late Onset ist generell öfter anzutreffen als das Early Onset PTLT.<sup>11</sup>

#### 1.4 Diagnostik der PTLT

Die Diagnose PTLT wird anhand der auftretenden Symptome, der klinischen Untersuchungen und der selektiven diagnostischen Tests gestellt. Unterstützt wird die Diagnose durch EBV spezifische Untersuchungen (Serologie), wie beispielsweise der EBV Viruslast im peripheren Blut.

Zu beachten ist, dass eine **definitive Diagnose nur histologisch** in Kombination mit immunhistochemischen und molekularen Untersuchungen an speziellen Zentren erfolgen kann.

#### 1.5 Konventionelle Therapie und Immuntherapie

Diverse Therapieoptionen sind zur Behandlung der PTLT beschrieben worden, dazu zählen die konventionelle Lymphomtherapie - einschliesslich chirurgischer, Strahlen- und Chemotherapie -, antivirale Strategien und immuntherapeutische Ansätze, z.B. Reduktion der Immunsuppression, Verabreichung von Zytokinen oder monoklonalen Antikörpern und adoptive T-Zelltherapien. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung sowie der oft fehlenden Zuordnung der PTLT zu bestehenden Subtypen hat sich jedoch keine allgemein akzeptierte Behandlungsstrategie etablieren können.<sup>7</sup>

##### 1.5.1 Immuntherapeutische Ansätze

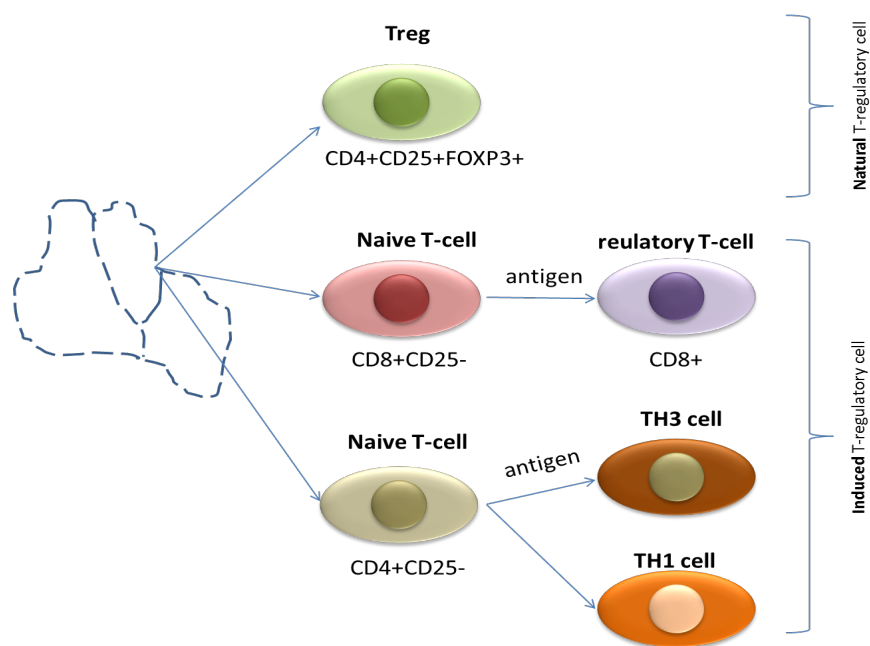
Die Reduktion der Immunsuppression wie von Starzel et al (1984) beschrieben, kann in einzelnen Fällen zum dauerhaften kompletten Verschwinden der Lymphoproliferationen führen. Dies gelingt vor allem bei Kindern mit polyklonalen mononukleoseähnlichen Lymphoproliferationen nach primärer EBV-Infektion. Grundsätzlich sollte bei allen Patienten mit PTLT die Immunsuppression reduziert werden, auch wenn ein objektivierbares Ansprechen oft ausbleibt. Einzelne Gruppen berichten von Remissionsraten von 60-80% nachdem bei Nierentransplantierten mit PTLT die immunsuppressive Therapie beendet wurde (Rees et al. 1998): Dieser Therapieansatz resultiert jedoch immer im Verlust des Transplantats, engt die therapeutischen Optionen bei erneuter Hämodialyse sehr ein und ist

bei Patienten mit Leber-, Lungen- und Herztransplantationen nicht durchführbar. Die Bestrahlung oder die chirurgische Exstirpation singulärer Läsionen kann im Einzelfall auch eine ausreichende therapeutische Massnahme darstellen.<sup>7</sup>

## 1.6 Regulatorische T-Zellen (Tregs) und ihre Funktionen

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind aufgeteilt in: T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen (Tregs). T-Helferzellen kontrollieren die erworbene Immunität gegen Pathogene, indem sie andere Effektor-Immunzellen aktivieren (Abb. 2).

Tregs sind CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die für die Unterdrückung von potenziell schädlichen Handlungen von T-Helferzellen gegen den Wirtsorganismus verantwortlich sind. Sie werden ihrerseits unterteilt in natürliche und induzierte Tregs.<sup>12</sup>



**Abb. 2 modifiziert nach Kingston et al. Natürliche und induzierte Tregs**

Natürliche und induzierte Tregs haben komplementäre und überlappende Funktionen in der Kontrolle der Immunantwort. Die natürlichen Tregs exprimieren den Oberflächenmarker CD25 und den transkriptionalen Hemmer FOXP3. Diese Zellen reifen und migrieren vom Thymus aus und ergeben 5-10% der peripheren T-Zellen. Die Population der induzierbaren Tregs beinhaltet verschiedene Subtypen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nämlich: regulatorische TH1-Zellen, welche ein hohes Niveau an IL-10, kein IL-4 und kein oder ein nur geringes Niveau

an IFN- $\gamma$  exprimieren; und TH3-Helferzellen, welche ein hohes Niveau an TGF- $\beta$  sezernieren.<sup>12</sup>

Tregs haben die Aufgabe, ein Antigen als harmlos zu tolerieren oder gegen Eindringlinge eine Immunreaktion zuzulassen. Sie tun dies, indem sie die T-Zell-Aktivierung regulieren, und so den Körper vor durch Pathogene induzierte Immunkrankheiten schützen.<sup>13</sup>

Einige persistente Viren induzieren Tregs, welche dann das protektive Immunsystem ausschalten und somit eine virale Persistenz fördern. Die Proportion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen ist bei Patienten mit replikativer EBV-Infektion in Form einer infektiösen Mononukleose signifikant höher als bei gesunden seropositiven Individuen mit einer latenten EBV-Infektion ( $p=0.05$ ). Die regulatorischen T-Zellen scheinen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der primären EBV-Infektion zu spielen. Es scheint, dass die infektiöse Mononukleose den Schutzmechanismus der Tregs hemmt.<sup>14</sup>

Nach der Entdeckung der Tregs fand ein Paradigmenwechsel in der Immunpathologie statt, wobei die CD4<sup>+</sup>-FOXP3 Zellen als essentiell für die Selbsttoleranz identifiziert wurden.<sup>15</sup>

Toleriertes Gewebe enthält T-Zellen, welche noch zur Gewebsabstossung fähig sind. Diese findet jedoch nicht statt, sofern regulatorische FOXP3 T-Zellen therapeutisch induziert werden.<sup>16</sup>

Solche peripher induzierten FOXP3 Tregs erhalten die Toleranz aufrecht, indem sie naive T-Zellen in die nächste Generation der FOXP3 regulatorischen T-Zellen überführen. Immunsuppressive Medikamente modulieren also die Anzahl und Funktion der zirkulierenden Tregs und der FOXP3-Expression.<sup>16</sup>

Allgemein können die unterschiedlichen Immunsuppressiva unterschiedliche Auswirkungen auf die Tregs haben. Experimentelle und klinische Studien konnten zeigen, dass mTOR-Hemmer einen positiven und Calcineurin-Hemmer einen negativen Effekt auf Tregs haben (Tab. 4). Ebenfalls scheint es, dass es weitere Faktoren gibt, welche einen Zusammenhang mit Kurz- und Langzeitergebnissen von Transplantaten zeigen. Während akuter Abstossungsreaktionen wurden eine erhöhte FOXP3-Genexpression, sowie ein erhöhter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3-Gehalt beobachtet.<sup>16</sup>

Eine Dysregulation des Treg-Gehaltes steuert zu einer Tumor-Entstehung bei. Eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen, gemessen durch eine erhöhte mRNA-Expression oder einer Proteinsynthese des Markers FOXP3 konnte oft bei der Entstehung neuer Tumoren nachgewiesen werden und geht mit einer ungünstigen Prognose einher.<sup>17</sup>

**Tab. 4 modifiziert nach Dummer et al: Effekt immunsuppressiver Medikamente auf Tregs**

Immunsuppressiva	Effekt auf regulatorische T-Zellen*
<b>Kortikosteroide</b>	Stimulieren FOXP3, erhalten die suppressive Aktivität und das Überleben der regulatorischen T-Zellen aufrecht
<b>Calcineurin-Hemmer</b>	Hemmen die FOXP3-Expression und unterdrücken möglicherweise die Funktion der regulatorischen T-Zellen
<b>mTOR-Hemmer</b>	Aufrechterhaltung der suppressiven Aktivität und Überleben der regulatorischen T-Zellen
<b>Mycophenolate mofetil (MMF)</b>	MMF haben keinen Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen
<b>IL-2R-Antagonisten**</b>	Variable Effekte, nicht genau bekannt
<b>T-Zell-abbauende Antikörper***</b>	Potenzielle Induktion von in vitro regulatorischen T-Zellen, aber kein Effekt in vivo

**Legende zur Tab.:** \* basierend auf in vitro und in vivo Studien, klinische Evidenz jedoch gering,

\*\* Basiliximab, Declizumab, \*\*\* Anti-thymozytisches Globulin, Alemtuzumab (Anti CD52))

### 1.6.1 Identifizierung der Tregs

Da alle regulatorischen T-Zellmarker (CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD127 und Foxp3) jede Art von T-Zell-Aktivierungen markieren, ist eine spezifische Identifizierung der Tregs so nicht möglich.<sup>18</sup>

Oft wird bei der Identifizierung der Tregs die Methode der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell-sorting, FACS) verwendet. Dabei können mehrere Fluoreszenz markierte Oberflächenproteine gleichzeitig auf einer Zelloberfläche identifiziert werden. Die Darstellung von Tregs am Gewebe ist jedoch sehr limitiert, da erstens maximal zwei Färbungen pro Zelloberfläche gefärbt werden können und zweitens für gewisse Antigene keine ausreichend guten Antikörper erhältlich sind.

Die Klassifizierung von Tregs als eigene „Familie“ bleibt kontrovers, denn die Fähigkeit zur Unterdrückung beruht nicht ausschliesslich auf die Fähigkeit der Tregs. Diese konnte, wenn

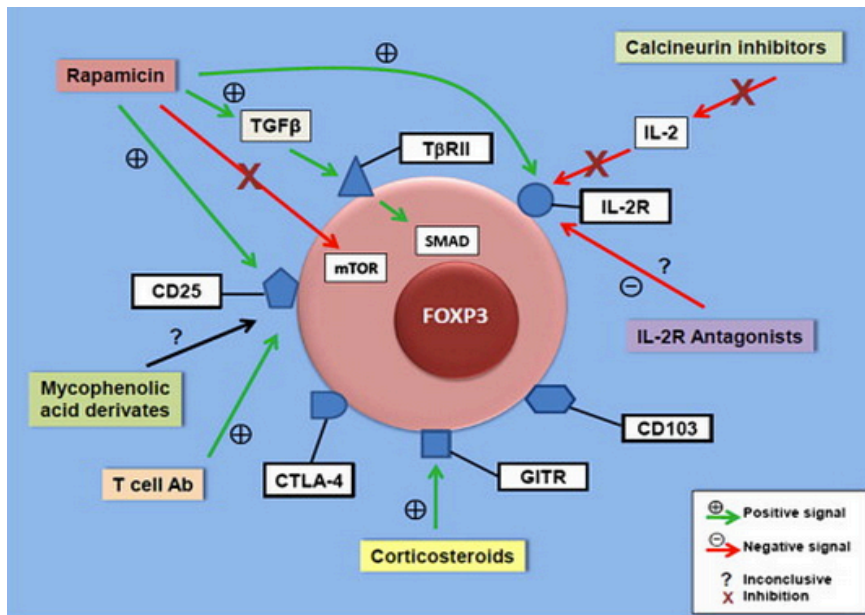


auch nur experimentell, ebenso in konventionellen T-Helferzellen (Th1, Th2, Th17 und folliculären T-Zellen T<sub>FH</sub>) nachgewiesen werden.<sup>18</sup>

### 1.6.2 FOXP3

#### FOXP3 allgemein

Die humane FOXP3-T-Zellpopulation ist sehr heterogen und enthält viele Subpopulationen, welche in der Literatur nur mangelhaft oder gar nicht beschrieben sind. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 und seine produzierten Proteine formen ein komplexes regulierendes Netzwerk (Abb. 3). Es stammt aus der Familie der Forkhead-Box-Proteine und ist der spezifischste Marker der regulatorischen T-Zellen, welcher von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Suppressorzellen exprimiert wird.<sup>19</sup> Durch andere T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen wird FOXP3 nicht exprimiert, durch CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten nur in geringer Masse. Über die Funktion des FOXP3 auf molekularem Level ist wenig bekannt. Einige Studien zeigen, dass FOXP3 an die intranukleäre DNA bindet, und als Hemmer des Transkriptionsfaktors in Konkurrenz zum schon im Kern vorhandenen Faktor von aktivierten T-Zellen NFAT agiert.<sup>20</sup> Da FOXP3 spezifisch für native und peripher entstandene Tregs ist, kann diese damit nachgewiesen werden. Auch wurde die erhöhte Bildung von immunsuppressiven Tregs in Tumorkranken beobachtet, wo Tregs wahrscheinlich die unterdrückende Rolle der Anti-Tumor-Immunantwort übernehmen.<sup>21</sup> Zudem wurden die FOXP3 Tregs bei einigen Krankheiten wie dem Diabetes Typ 1, der Multiplen Sklerose, dem systemischen Lupus erythematoses und der rheumatoiden Arthritis vermehrt festgestellt.<sup>22</sup> So wurde auch gezeigt, dass Mutationen im FOXP3-Gen zu einer polyendokrinen Autoimmunerkrankung führen, da die Tregs Autoimmunreaktionen unterdrücken.<sup>23</sup>



**Abb. 3 modifiziert nach Dummer et al. Effekte immunsuppressiver Medikamente auf Tregs**

#### FOXP3 in Tumoren ausserhalb von PTLD

Eine erhöhte Anzahl von FOXP3-Tregs im peripheren Blut ist assoziiert mit verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise mit dem kolorektalen Karzinom.<sup>24</sup> Allerdings sind die Aussagen über deren prognostische Wertigkeit sehr widersprüchlich.<sup>13</sup> So konnte gezeigt werden, dass CLL-Patienten eine höhere Anzahl zirkulierender Tregs aufweisen als die Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ). Eine eindeutige Erhöhung der Tregs konnte vor allem in späteren Stadien, welche eine erhöhte Anzahl FOXP3 exprimierender CD4<sup>+</sup>CD25-T-Zellen und eine unveränderte Anzahl FOXP3 exprimierender CD4<sup>+</sup>CD25-T-Zellen, beobachtet werden.<sup>25 26</sup>

#### FOXP3 in PTLD

Uns sind keine Studien bekannt, welche den Zusammenhang der PTLD und FOXP3 auf Proteinebene untersuchten.

### **1.6.3 CD3**

#### CD3 allgemein

Der CD3-Rezeptor ist ein Protein-Komplex, der aus vier verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut ist. Zusammen mit dem T-Zellrezeptor bildet der CD3-Rezeptor den TCR-CD3-Komplex, der zur Aktivierung von T-Zellen dient.

### CD3 in Tumoren ausserhalb von PTLD

Eine Erhöhung der Ratio CD3-T-Zellen/Tregs in kolorektalen Karzinomen wurde mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit in Zusammenhang gebracht.<sup>24</sup>

### CD3 in PTLD

In der immunhistochemischen Färbung einer PTLD im Kolon, welche nach einer Lebertransplantation entstand, konnte zeigen, dass die Anzahl an CD3 erhöht ist.<sup>27</sup>

## **1.7 Zielstellung**

In unserer Studie wird zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen FOXP3 positiven Tregs bzw. CD3 in der Mikroumgebung von PTLDs untersucht. Bisher sind uns keine weiteren Studien dazu bekannt.

Unsere Zielstellung ist es, FOXP3 bzw. CD3 mit immunhistochemischen Methoden an primären Tumorgeweben von transplantierten Patienten nachzuweisen. Dies alles wird mit Hilfe von bildgebenden Methoden ausgewertet und evaluiert, mit dem Ziel, Unterschiede in der Mikroumgebung zwischen PTLD und CLL zu finden. Die CLL wurde gewählt, weil sie im Unterschied zur PTLD ein vergleichsweise homogen zusammengesetztes Lymphom darstellt, nicht mit EBV und nicht mit Immunsuppressiva assoziiert ist.

In einem kleinen Patientenkollektiv, von dem Folgebiopsien vorliegen, soll der zeitliche Verlauf der FOXP3 bzw. CD3- Expression untersucht werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Anzahl von FOXP3 bzw. CD3 eine prognostische Relevanz hat. Diese soll dann mit der Kontrollgruppe von Patienten mit chronisch lymphozytischem Lymphom (CLL), für die es in der Literatur Bezugsdaten gibt, verglichen werden.

## **2 PatientInnen und Methoden**

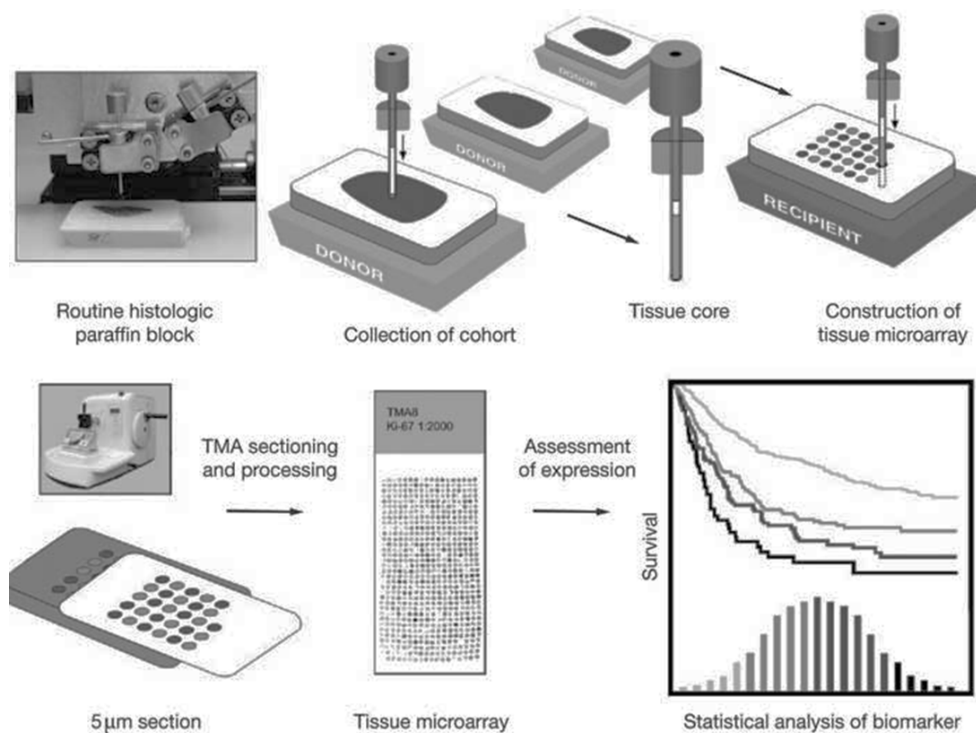
### **2.1 Patienten, Material, Datenquellen**

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Studie, welche von der kantonalen Zürcherischen Ethikkommission genehmigt wurde (StV2-2007). Im institutsinternen Archiv des Institutes für klinische Pathologie des UniversitätsSpitals Zürich suchten wir nach Biopsien von Patienten, bei denen zwischen 1996 und 2008 eine PTLD diagnostiziert worden war. Die Gewebe wurden in einer akkreditierten Gewebebank aufbewahrt (STS 548) und erfüllen entsprechend die Standards nach ISBER (International Society of Biological and Environmental Repositories). Beim Untersuchungsmaterial handelte es sich um Biopsien, die ursprünglich Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, aufbewahrt wurden. Vor Einschluss in die aktuelle Doktorarbeit wurden die Diagnosen der ausgewählten Biopsien morphologisch und mittels Immunhistochemie (IHC) auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Diagnose der PTLDs wurde nach der aktuellen WHO-Klassifikation des Jahres 2008 klassifiziert.<sup>3</sup> Nachdem auf den histologischen Schnitten (HE-Färbung) ein geeignetes Areal ausgesucht wurde, konnten die Biopsien und Spenderblöcke der Gewebechip-Technik (TMA) zugeführt werden. Die Daten wurden anonymisiert verarbeitet.<sup>28 29 30</sup>

### **2.2 Tissue microarray (TMA)**

Unter einem Tissue microarray wird ein Multigewebeblock verstanden. Dabei werden ausgestanzte Gewebezyylinder aus zahlreichen Spenderblöcken mit einem scharfen Hohlzylinder entnommen und auf einem neuen Paraffinblock (TMA-Block) zusammengesetzt.<sup>28</sup> Da Tumoren heterogen aufgebaut sein können, werden pro Tumor und Patient zwei bis drei Gewebezyylinder entnommen, um für die weiteren Untersuchungen eine hohe Repräsentativität der Proben zu garantieren. Der neu entstandene TMA-Block kann bis zu tausend solcher Gewebezyylinder enthalten. In unserem Fall waren das 168 CLL-Patienten und 37 PTLD-Patienten (32 PTLD und 5 Medikamenten induzierte PTLD). Davon dann jeweils 3-9 Gewebezyylinder pro Patient.

Daraus können anschliessend multiple Schnitte angefertigt werden. Die TMA-Technik stellt ein einmaliges Standardverfahren dar, um gleichzeitig und in einem Durchgang alle Gewebeproben, welche den gleichen Versuchsbedingungen unterstehen (Schichtdicke, Inkubationsdauer bei den Färbungen und Hybridisierung) auf die untersuchten Parameter zu analysieren (Abb. 4). Ausserdem handelt es sich bei diesem Verfahren um eine schnelle und preiswerte Methode.



**Abb. 4 Herstellung eines Tissue microarrays**

Mit einem scharfen Hohlzylinder (Innendurchmesser 0.6mm) wird aus dem Spenderblock eine Gewebeprobe entnommen. Durch Überlagerung des Schnittes mit dem Spenderblock kann der gewählte Bereich im Spenderblock besser identifiziert werden. Die Gewebestücke werden in den Empfängerblock ausgestossen, indem ein Stahldraht (Aussendurchmesser 0.6mm) in den Hohlzylinder eingeführt wird. Durch konventionelle Verarbeitung des Empfängerblocks können multiple Schnitte angefertigt werden.<sup>28</sup>

## 2.3 Immunhistochemie (IHC)

Bei der IHC werden spezifische Antikörper verwendet, um die präzise Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene zu ermitteln. Um die gebundenen Antikörper (Tab. 5) sichtbar zu machen, können entweder die primären Antikörper selbst mit einem Markermolekül gekoppelt werden (direkte Methode) oder die primären Antikörper durch markermolekültragende sekundäre Antikörper gebunden werden (indirekte Methode).<sup>31</sup>

Die Routineparaffinschnitte wurden durch das Biopsielabor des Institutes für Klinische Pathologie angefertigt. Die konventionelle und immunhistochemische Anfärbung der TMAs erfolgte, automatisiert auf einem Ventana Benchmark® (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA), nach einer ChipSpread Vorbehandlung im Labor für in Situ Techniken (Leitung: PD Dr. med. M. Tinguely).

**Tab. 5 Benutzte Antikörper und Proben für in situ Hybridisierung**

Test	Spezies	Klon	Verdünnung	Produzent
<b>CD3</b>	Rabbit	SP7	1:100	Neo-Markers/Lab Vision Corporation
<b>FOXP3</b>	Rabbit	-	1:400	Abcam Limited
<b>EBNA2</b>	Mouse	PE2	1:50	DAKO A/S
<b>LMP</b>	Mouse	CD1-4	Pre-diluted	VentanaCell Marque
<b>EBER-ISH-Probe</b>	EBER	-	Pre-diluted	Leica microsystems

## 2.4 Visuelle Schätzung am Bildschirm vs. Auswertung mittels Computer unterstützter Signal-Markierung

### Visuelle Schätzung

Die gefärbten TMAs wurden mittels des slide scanners (Hamamatsu NanoZoomer 2.0 –HT) eingescannt und am PC abgerufen. Jeder einzelne Spot wird zur Übersicht nach Fallnummer nummeriert. CD3- bzw. FOXP3-positive Zellen sind durch die Markierung mit einer Peroxidase braun gefärbt. Die visuelle Abschätzung der CD3- bzw. FOXP3-positiven Zellen erfolgt pro Fläche (Spot), d.h. die gefärbten Zellen im Verhältnis zur gesamten Fläche werden prozentual abgeschätzt. Die Einteilung wurde wie folgt bestimmt: 1%, 3%, 5%, 10% 15% und in 5er Schritten bis 100%. Die PTLD- bzw. CLL-Gewebeproben wurden nur dann ausgewertet, wenn mindestens 300 FOXP3- bzw. CD3-positive Zellen nachweisbar waren.

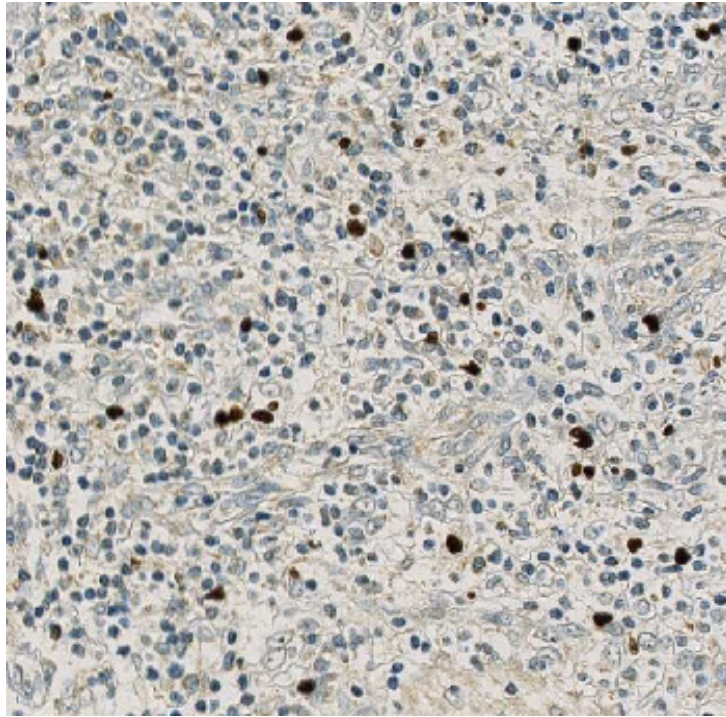
### Auswertung mittels Signalmarkierung am Bildschirm

Die obengenannten, visuell abgeschätzten Spots werden nun anhand einer Signalmarkierung am Bildschirm ausgewertet (Abb. 5). Um die FOXP3-Zellen sichtbar zu machen wurde eine Kernfärbung, bei den CD3-positiven Zellen dagegen eine zytoplasmatische bzw. membranäre Färbung ausgewertet.

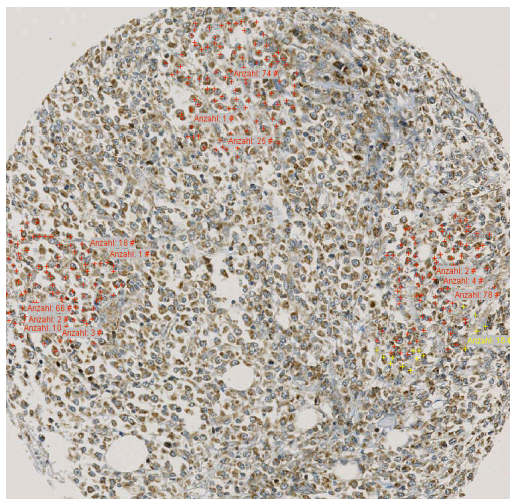
Da die Spots nicht immer eine homogene Fläche besitzen, werden pro Spot 300 Zellen in 3 verschiedenen Bereichen ausgezählt. 100 Zellen werden bei 9 Uhr, 100 Zellen bei 12 Uhr und 100 weitere bei 3 Uhr ausgezählt (Abb.5). Die Summe der gefärbten, CD3- bzw. FOXP3-positiven Zellen wird danach durch 300 Zellen geteilt und daraus ergibt sich der prozentuale Anteil der gesuchten Zellen.

Um die Spots danach auszuwerten stellte uns das Institut für klinische Pathologie einen Instituts-intern entwickelten Viewer zur Verfügung. Die Auflösung der Bilder bei 40facher Vergrößerung beträgt: 1pixel=0.23um.

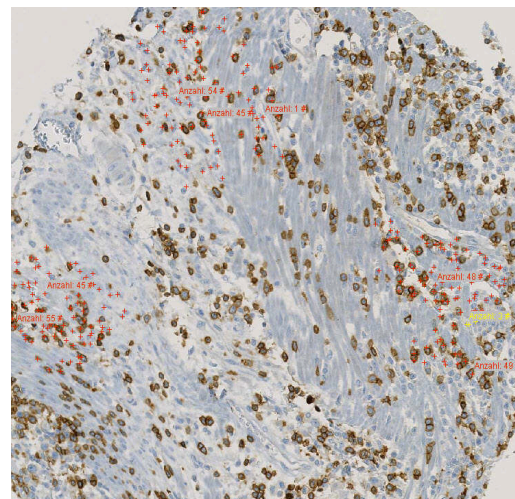
**a**



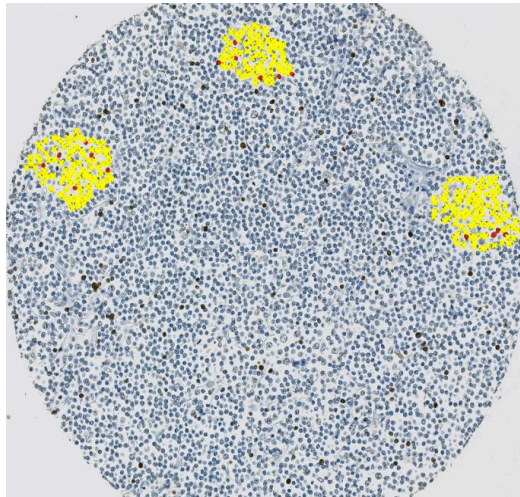
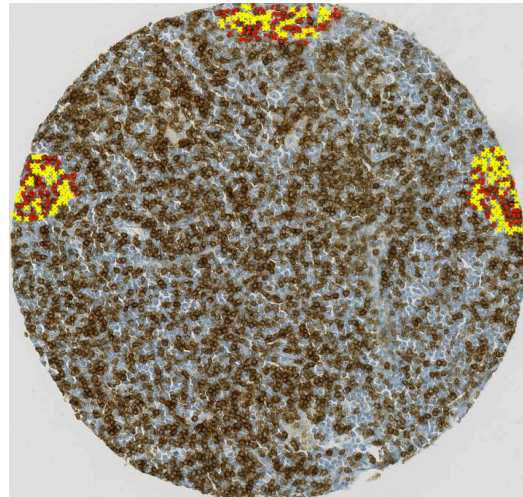
**b**



**c**





**d****e**

**Abb. 5 PTLD- und CLL-Spots**

Die Spots wurden mit dem Instituts-intern entwickelten Viewer ausgezählt. **a** Vergrößerter Ausschnitt, Patient 3-1, PTLD, FOXP3. Die dunkel gefärbten Kerne entsprechen FOXP3 positiven Zellen **b** Patient 40-3, PTLD, FOXP3-Färbung **c** Patient 24-3, PTLD, CD3-Färbung **d** Patient 2-2, CLL, FOXP3-Färbung. Rot wurden die FOXP3-positiven T-Lymphozyten markiert, gelb wurden alle FOXP3-negativen Zellen markiert in jeweils einem der drei Quadranten, sodass gesamthaft 300 Zellen gezählt wurden. **e** Patient 18-2, CLL, CD3-Färbung. Rot wurden die CD3-positiven T-Lymphozyten markiert, gelb wurden alle CD3-negativen Zellen markiert, sodass zum Schluss 300 Zellen in 3 verschiedenen Quadranten pro Spot ausgezählt wurden.

## 2.5 Epidemiologie und statistische Methoden

Die Messwerte wurden im Excel kodiert und mit SPSS® (Version 20.0 für Mac®, ©SPSS Inc., Chicago, USA) in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biostatistik des Instituts für Sozial- und Präventivmedizin analysiert (Dr. Malgorzata Roos). Die deskriptiven statistischen Parameter (Mittelwert, Standardabweichung, Min, Max, Interquartilbereich, 95% Vertrauensintervall für den wahren Mittelwert) wurden berechnet (Tab. 7 und 8). Die Überprüfung der Wiederholbarkeit zwischen geschätzten und gezählten Werten wurde mittels des nicht parametrischen gepaarten Wilcoxon-Tests und der Bland-Altman-Plots untersucht. 95% limits of agreement (LoA) wurden ermittelt. Mittels Log Rank-Test und Cox-Regression wurde der univariate Einfluss der erklärenden Variablen (Tab. 9) auf die Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht. Die Kaplan-Meier-Analyse diente der grafischen Darstellung der Resultate. Der Einfluss einer binären erklärenden Variablen auf eine stetige Zielvariable wurde mittels des zwei-Stichproben-T-Tests im Fall von normalverteilten Daten und mittels eines Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests im Fall der Verletzung der Annahme der Normalverteilung untersucht. Die Assoziation zwischen einer diskreten erklärenden



Variablen (mit mehr als zwei Stufen) und einer stetigen annähernd normalverteilten Variablen wurde mittels der einfachen ANOVA berechnet. Gemäss einer biostatistischen Konvention wurde ein Einflussfaktor erst dann als statistisch signifikant eingestuft, wenn der p-Wert kleiner als 0.05 betrug.

#### Die Kaplan-Meier-Schätzung

Der Kaplan-Meier-Schätzer dient zum Schätzen der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines Zeitintervalls nicht eintritt. Es handelt sich um einen nichtparametrischen Test der Überlebensfunktion im Rahmen der Ereigniszeitanalyse (Abb.14).

#### Cox-Regression

Die Cox-Regression wird zur Modellierung von Überlebenszeiten in der Überlebensanalyse benutzt und basiert auf dem Konzept der Hazardrate. Die wichtigste Annahme bei der Cox-Regression ist, dass der Quotient der Ausfall-Raten von verschiedenen Gruppen konstant ist über die Zeit. Die Ausfallrate ist eine Kenngrösse für die Zuverlässigkeit eines Objektes. Sie gibt an, wie viele Objekte in einer Zeiteinheit durchschnittlich ausfallen. Mit der Cox-Regression werden Überlebensdaten mit einer oder mehreren Einflussgrössen in Zusammenhang gebracht.

#### Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Der Wilcoxon-Mann-Whitney ist ein parameterfreier statistischer Test. Er dient zur Überprüfung ob ein Unterschied im Median zwischen zwei Verteilungen vorliegt.

#### T-Test

Dasselbe wie Mann-Whitney, nur versucht der T-Test den Unterschied in Mittelwerten in annähernd normalverteilten Daten zu entdecken.

#### ANOVA

Die Varianzanalyse versucht Unterschiede im Mittelwert zwischen verschiedenen Stufen eines Faktors in annähernd normalverteilten Daten zu entdecken.

### **3 Resultate**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Das mittlere Alter unseres Patientenkollektivs (Tab. 6) betrug bei der Transplantation 43.5 Jahre (minimal: 6J, maximal 75J). Die unter 18-jährigen machten 12% (4 von 32), Patienten zwischen 18 und 60 Jahren 72% (23 von 32) und die über 60-jährigen 16% (5 von 32) aus (Abb. 6). 20 von 32 (63%) sind weiblich und 12 von 32 (37%) Patienten sind männlich. 13 von 32 Patienten (41%) sind verstorben, 12 von 32 (38%) Patienten haben bei der letzten Untersuchung (August 2012) noch gelebt und bei 7 von 32 der Fälle ist nicht bekannt, ob sie leben oder bereits verstorben sind (Min: 0 Jahre, Max: 13 Jahre, Mittelwert 4.4 Jahre Überleben nach Diagnosestellung). 14 von 32 lebten weniger, während 10 von 32 Patienten länger als 5 Jahre nach Transplantation lebten (Abb.7).

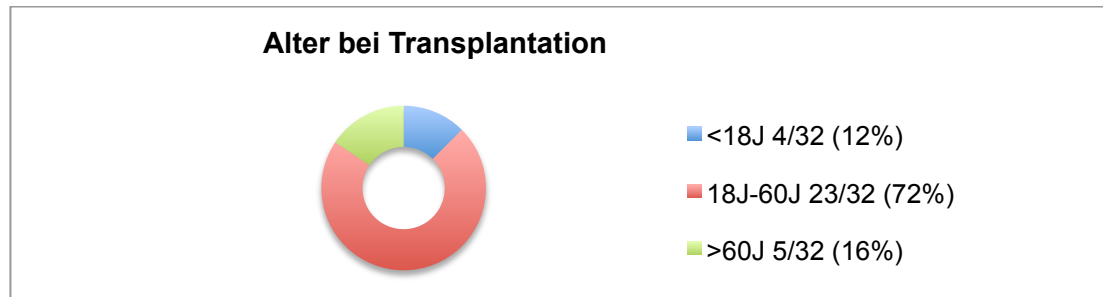
In 18 von 32 (56%) der Fälle lag eine monomorphe PTLD im Sinne eines hochmalignen B-Zell-Lymphomes, bei 2 von 32 der Fälle lag uns ein monomorphes, klassisches Hodgkin Lymphom (6.25%) und in 11 von 32 (34%) der Fälle eine polymorphe PTLD vor. In 10 von 32 (31%) Patienten lag die PTLD nodal, bei 18 von 32 (56%) Patienten extranodal und bei 4 von 32 (13%) Fällen sogar im transplantierten Organ vor (Abb. 8).

Die minimale Zeitspanne von der Transplantation bis zur Diagnose PTLD betrug 2 Monate, die maximale 15 Jahre, der Mittelwert beträgt 4.8 Jahre. Die klinische Diagnosestellung erfolgte über einen Zeitraum von 12 Jahren, nämlich zwischen 1996 und 2008. Die Beobachtungszeit (Follow up) betrug minimal 5 Monate und maximal 14 Jahre (168 Monate). Zum Zeitpunkt der letzten Aktualisierung (August 2012) waren 13 von 31 (41%) der Patienten verstorben.

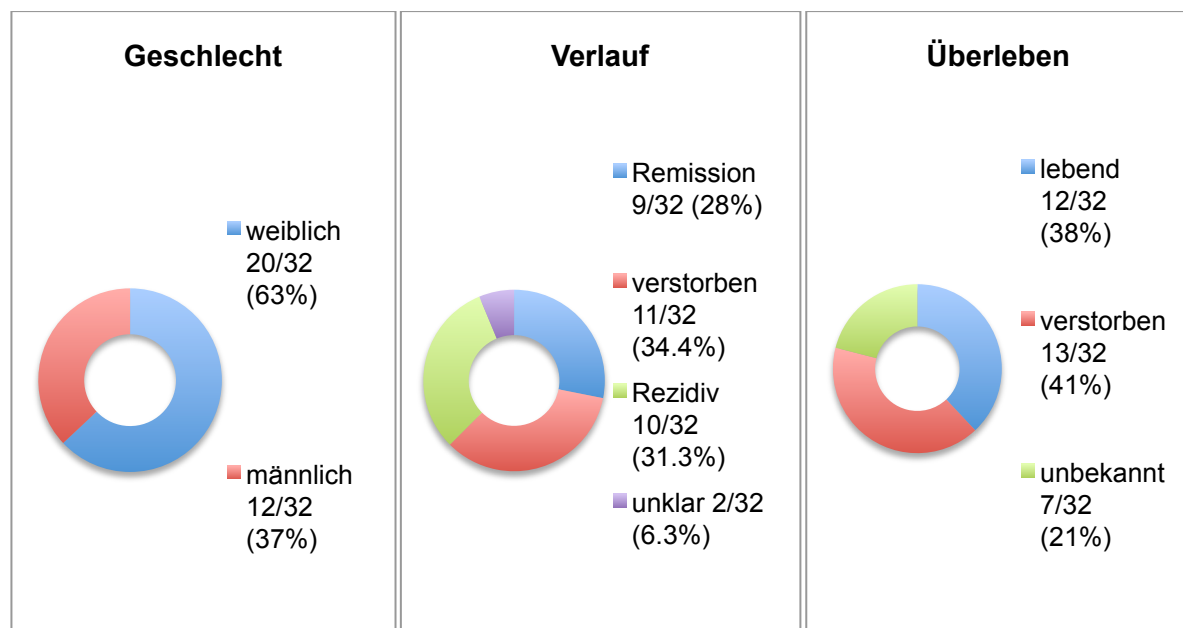
Bei 9 von 32 (28%) wurde ein Herz, bei 8 von 32 (25%) eine Niere, bei 6 von 32 (19%) eine Lunge, bei weiteren 6 von 32 (19%) wurde eine Kombination von Organen, bei 2 von 32 eine Leber (6.25%) und bei 1 von 32 (3.1%) Fällen Knochenmark transplantiert. In 9 von 32 Fällen (28%) haben wir eine Early Onset PTLD (<12 Monate nach Transplantation) und 23 von 32 (72%) Patienten weisen eine Late Onset PTLD (>12 Monate nach Transplantation) auf (Abb. 9).

24 von 32 Patienten (75%) sind EBV-positiv und 8 von 32 (25%) sind EBV-negativ. 20 von 32 Fällen sind klonal, 4 von 32 sind nicht klonal und bei den weiteren 8 von 32 Patienten ist es unklar. In 3 Fällen wechselte die Klonalität von nicht-klonal zu klonal. Ein umgekehrter Fall ist uns nicht bekannt. Bei 15 von 32 Patienten haben wir einen Latenztyp III, bei 4 von 32 einen lytischen Latenztyp, bei 3 von 32 einen Latenztyp I und bei 1 von 32 Patienten einen Latenztyp II (Abb. 10).

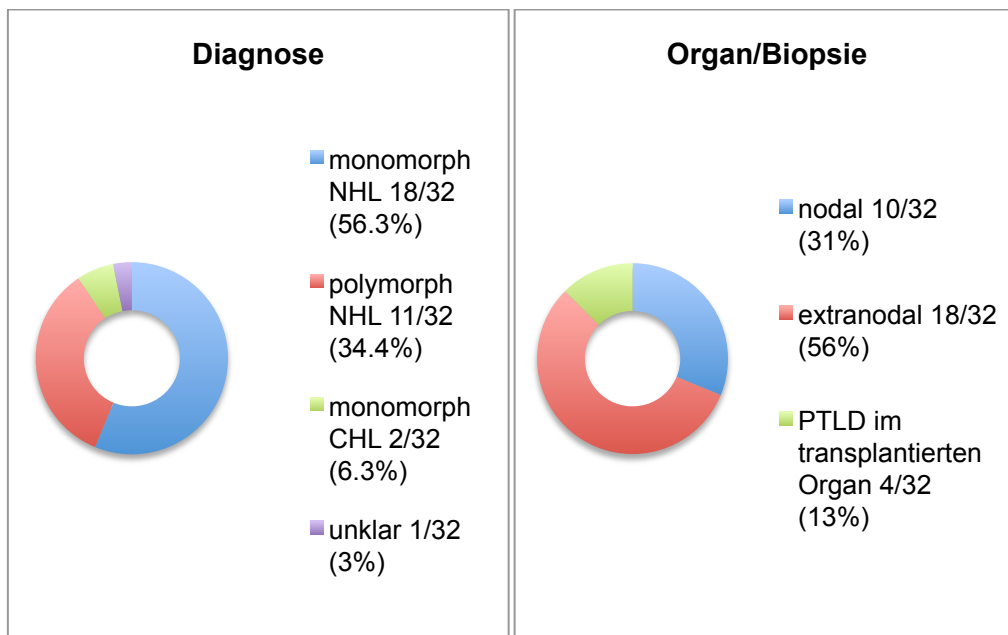
Bei den 5 Patienten mit angeborener oder erworbener Immundefizienz sind 4 davon männlich und 1 Patient weiblich. Der jüngste Patient ist 47 und der älteste 72 Jahre alt, das mittlere Alter beträgt 59.8 Jahre. 3 von 5 Patienten überlebten und 2 von 5 sind verstorben. 3 von 5 Patienten sind EBV-negativ, und 2 von 5 sind EBV-positiv.



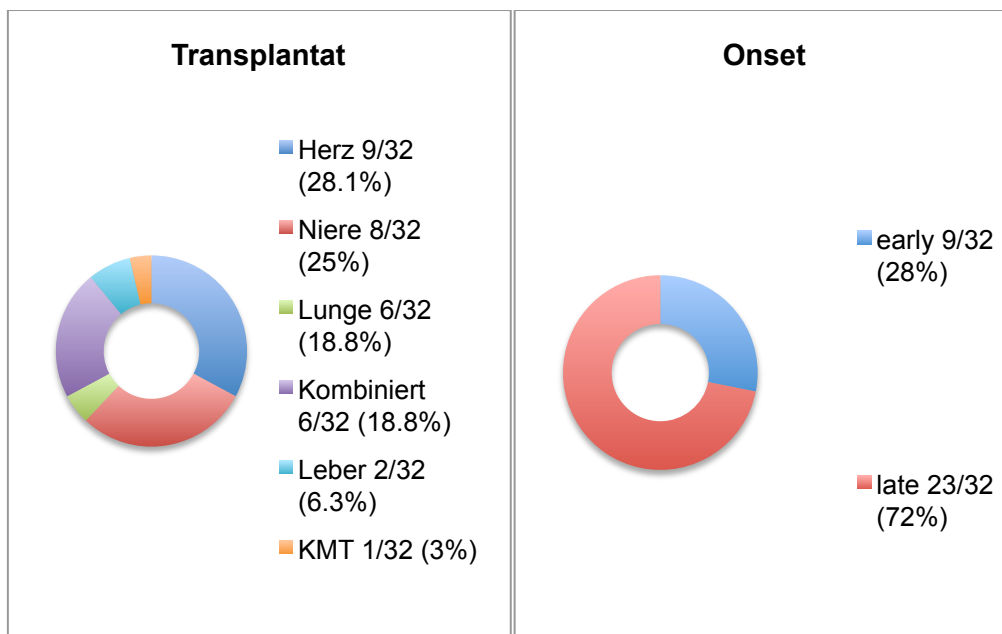
**Abb. 6 Alter zum Zeitpunkt des Transplantation**



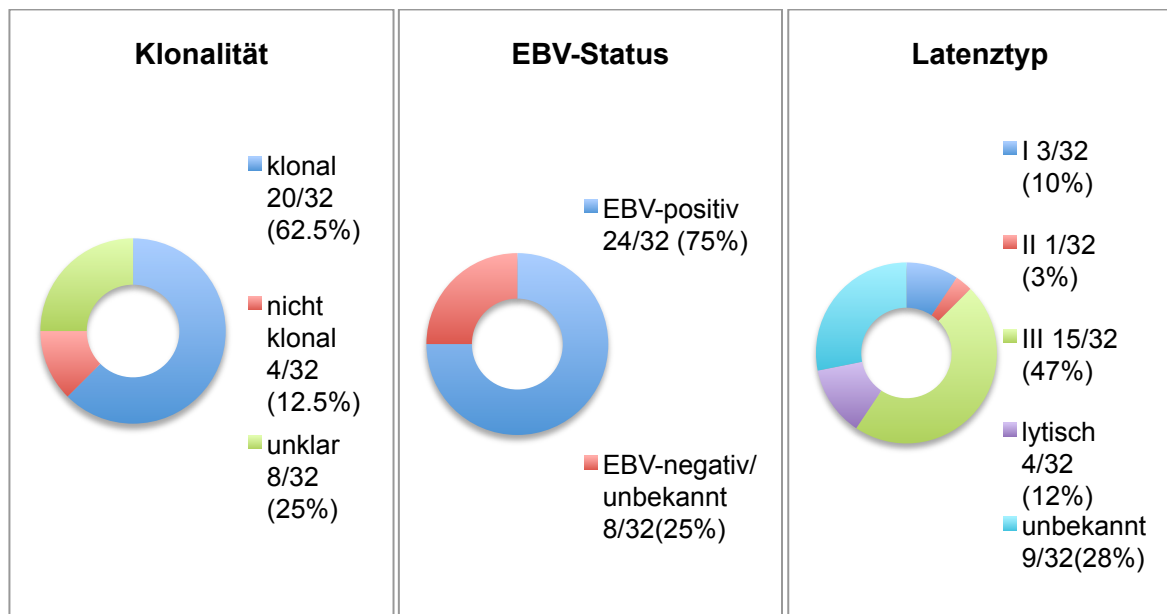
**Abb. 7 Geschlecht, Verlauf und Überleben**



**Abb. 8 Diagnose und Biopsie des von PTLD betroffenen Organs**



**Abb. 9 Transplantat und Zeitpunkt der PTLD-Diagnose nach Transplantation sog. "Onset"**



**Abb. 10 Klonalität, EBV-Status und Latenztyp**

Bei allen 32 Patienten (und den 5 Patienten aus der Kontrollgruppe mit angeborener oder erworbener Immundefizienz) wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt und das Überleben berechnet. Patient 3 wurde wegen Gewebemangels aus der Studie herausgenommen (Tab. 6).

**Tab. 6 Zusammenstellung der wichtigsten Daten des untersuchten Patientenkollektivs mit PTLD**

Pat. Nr	Alter (J) / Gender	Status	Follow up (Mo) post-PTLD	Transplantat	Biopsie	EBV	Latenz	Onset	Diagnose PTLD
1	43/w	†	0	Niere/ PK	tt	+	III	early	polymorph
2	55/m	†	-	Lunge	en	+	III	late	monomorph
3	50/m	†	24	Herz	en	+		late	-
4	46/w	†	-	Lunge	tt	+	III	early	polymorph
5	64/m	-	-	Herz	en	+	IV	early	monomorph
6	17/w	-	-	Lunge	tt	+	III	late	monomorph
7	53/m	†	22	Niere	en	+	III	late	polymorph
8	23/m	lebt	144	Niere	n	+	III	early	polymorph
9	22/m	†	32	Lunge	en	+	III	early	monomorph
10	13/w	lebt	156	Herz	n	+	IV	late	polymorph
11	60/m	-	-	Herz	en	+	III	late	monomorph
12	65/m	†	0	Niere	n	-		late	polymorph
13	52/w	†	0	Niere	en	+	III	late	monomorph
14	23/m	†	14	Leber/ Niere	n	+	IV	late	monomorph
15	58/w	-	-	Herz	en	+	III	late	monomorph
17	62/w	lebt	1	Niere	n	+	II	late	polymorph
18	65/w	†	5	Leber	n	-		late	monomorph
19	60/m	lebt	102	Niere	en	+	III	late	polymorph
20	12/m	-	-	KMT	en	+	III	early	polymorph
21	45/m	lebt	107	Lunge	en	-		late	monomorph
23	21/m	lebt	97	Herz	n	+	I	late	-
24	51/m	lebt	99	Leber	en	+	IV	early	monomorph
25	75/m	†	4	Herz	en	-		late	monomorph
26	35/w	lebt	91	Niere	en	-		late	monomorph
27	35/m	lebt	61	Herz/ Niere	n	-		late	-
28	36/w	lebt	83	Herz	n	-		late	polymorph
29	6/w	-	78	Herz	en	+	III	early	monomorph
30	47/m	†	4	Lunge	n	-		late	monomorph
31	54/m	†	27	2x Lunge	tt	+	III	early	polymorph
32	41/m	lebt	76	Niere	en	+	I	late	monomorph
33	57/m	-	-	Herz/ Lunge	en	+	I	late	monomorph
34	47/w	lebt	48	Niere/ PK	en	+	III	late	monomorph

**Legende für Tab.6:** n nodal, en extranodal, tt Tumor im Transplantat, PK Pankreas

### 3.1.1 Rezidivpatienten

Bei 5 von 32 Patienten beobachteten wir zwei bis vier Rezidive (Abb. 11 a-e). Bei einem von den fünf Rezidivpatienten (Patient 10) erhielten wir bis zum Abschluss der Studie insgesamt fünf Folgebiopsien, wobei die letzte nur gerade im Abstand von einem Monat zuerst in einem Lymphknoten (nodal) und dann dem ZNS (extranodal) erfolgte (Abb.11a). Interessant ist hier vor allem, dass vier von den fünf Patienten auch nach mehrmaligen Rezidiven mit einer mittleren Überlebenszeit von 86 Monaten (7.6 Jahren) nach der ersten PTLD-Diagnose (respektive sogar 106 Monate oder 8.8 Jahre, wenn nur die überlebenden Patienten mit in den Beobachtungszeitraum eingeschlossen werden) das mittlere Gesamtüberleben überschreiten und somit einen eher günstigen Verlauf aufweisen.

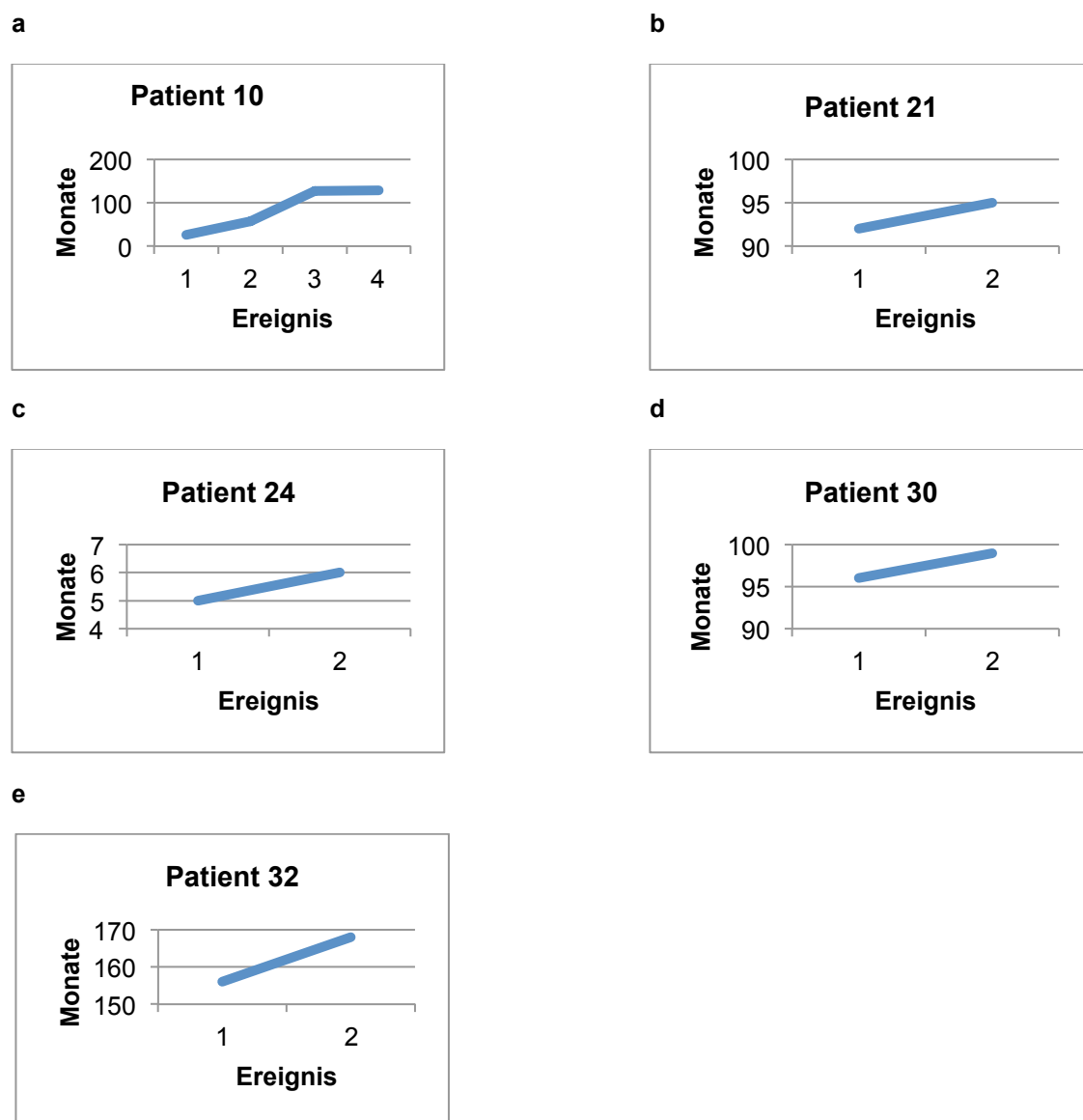


Abb. 11 a-e Rezidivpatienten, welche ein oder mehrere Rezidive aufwiesen: In der Y-Achse ist die Zeit nach Transplantation bis zur Diagnose PTLD (in Monaten), auf der X-Achse die Anzahl Rezidive als Ereignis aufgeführt.

## **3.2 Statistische Erhebungen**

Im Folgenden haben wir untersucht, welche der durchgeführten Untersuchungsmethoden zur Auswertung der immunhistochemischen Marker geeigneter ist. Dafür nahmen wir die Bland-Altman-Plots zu Hilfe (Abb.12). Zuerst untersuchten wir nur die PTLD-Gruppe und im Anschluss stellten wir die Resultate der Kontrollgruppe mit CLL gegenüber. Zusammenfassend haben wir alle Daten in einer Tabelle (Tab. 7) dargestellt. Mit den Boxplots zeigen wir den Unterschied zwischen FOXP3 und CD3, zunächst nur in der PTLD-Gruppe alleine, danach im Vergleich zur Kontrollgruppe mit CLL (Abb. 13 und Abb. 14).

### **3.2.1 Welche Untersuchungsmethode ist besser?**

In den folgenden Untersuchungen haben wir analysiert, welche Untersuchungsmethode zur Analyse der immunhistochemischen Marker die bessere ist: die Schätzung oder die Zählung? Aus den Daten geht hervor, dass die Schätzungen ziemlich genau waren. Aus den Bland-Altman-Plots geht auch hervor, dass sowohl für FOXP3 als auch für CD3 bei einer kleineren Anzahl FOXP3 bzw. CD3 eine genauere Schätzung gegeben werden konnte als bei einer höheren Anzahl.

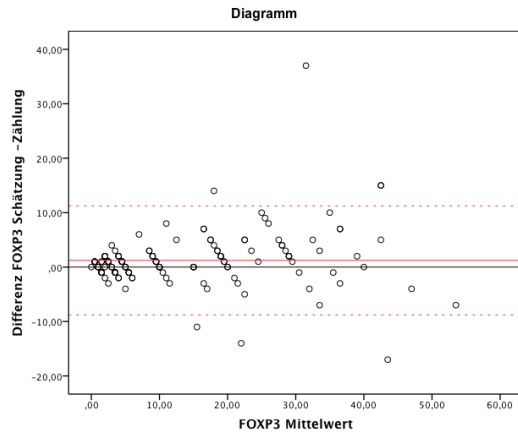
Wo wurde untersucht? Zunächst haben wir die Schätzung und Zählung der PTLD-Gruppe alleine untersucht, danach stellten wir die PTLD-Gruppe der Kontrollgruppe mit CLL gegenüber. Die limits of agreement (LoA) waren bei den FOXP3 (-8.79;11.25), während die mittlere Differenz 1.23 betrug (Abb. 12a). Das heisst, wir hatten bei den FOXP3 die Anzahl gezählter T-Zellen tendenziell überschätzt und die Anzahl geschätzter T-Zellen tendenziell unterschätzt. Die LoA waren bei CD3 (-10.41;7.71) und die mittlere Differenz betrug -1.35 (Abb. 12b). Die LoA für FOXP3 beim Vergleich der PTLD-Gruppe mit der CLL-Kontrollgruppe betrugen für CLL: -5.5;6.7 und für PTLD: -7.1;10.3 (Abb. 12c), während die LoA für CD3 folgende waren: CLL -11.2;14.4, PTLD: -6.2;4.4 (Abb. 12d).

Aus diesen Untersuchungen ziehen wir die Schlussfolgerung, dass die Schätzung und die Zählung annähernd gleich sind, wir uns dennoch bei der weiteren Auswertung der Daten auf die gezählten Werte gestützt haben, da wir bei der Schätzung vergleichsweise mehr ausschweifende Werte beobachten konnten.

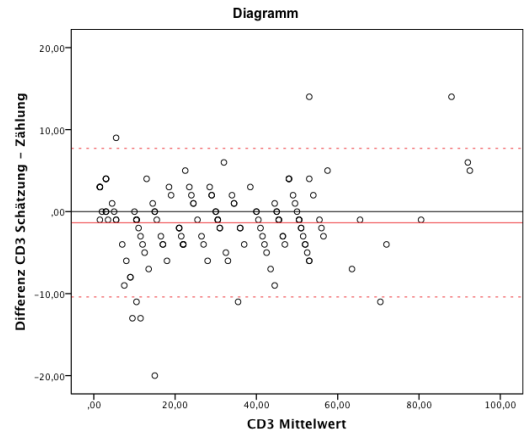


### 3.2.2 Bland-Altman-Plots für PTLD alleine und PTLD im Vergleich zur Kontrollgruppe CLL

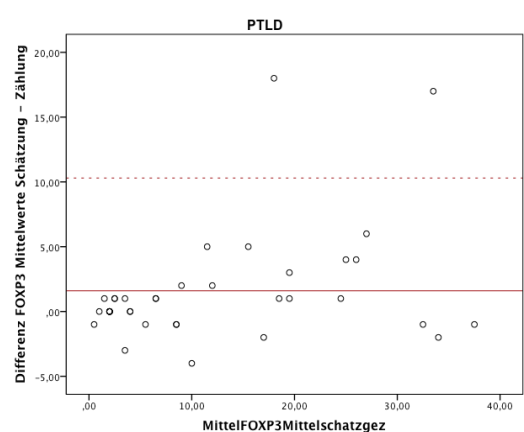
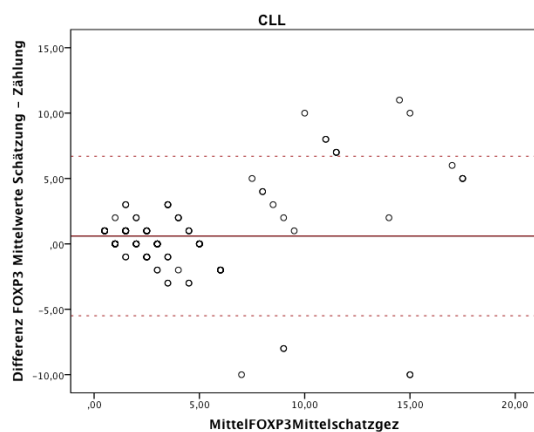
a. Bland-Altman-Plot, FOXP3



b. Bland-Altman-Plot, CD3



c. Bland-Altman-Plots, FOXP3 bei CLL und PTLD



d. Bland-Altman-Plots CD3 bei CLL und PTLD

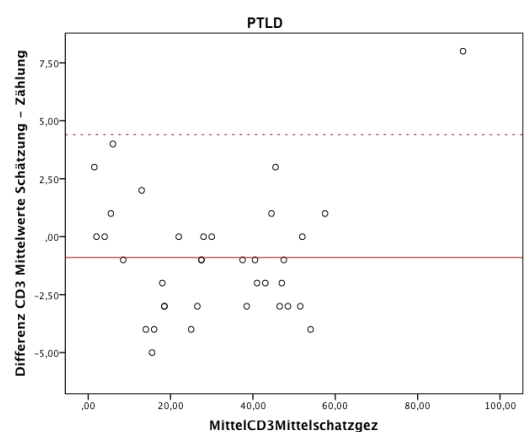
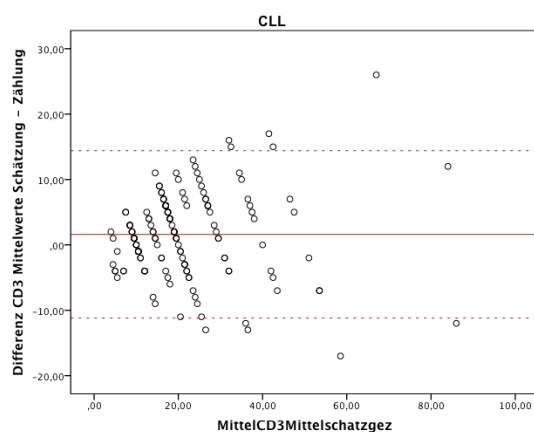


Abb. 12 Bland-Altman-Plots in PTLD und in CLL

**Tab. 7 Zusammenfassung aller geschätzten und gezählten Resultate: Deskriptive Statistik der 32 PTLDs und 5 durch Medikamente induzierte PTLD-ähnlichen Läsionen**

Färbung Code	Mittelwert	SD	Min	Max	95% VI	IQR
<b>sFOXP3</b>	14.2	13.4	0	50	12 ; 16.4	17
<b>gFOXP3</b>	13	12.5	0	57	10.9 ; 15	35
<b>sCD3</b>	30.1	21	1	95	26.6 ; 33.7	35
<b>gCD3</b>	31.1	20	0	90	27.9 ; 34.5	30
<b>DFOXP3s_g</b>	1.2	5.1	-17	37	0.4 ; 2	3
<b>DCD3s_g</b>	-1.3	4.6	-20	14	-2.1 ; -0.5	5
<b>FOXP3sM 0</b>	4.4	4.6	1	20	3.7 ; 5.2	3
<b>FOXP3sM 1</b>	13.2	12.1	0	42	9.2 ; 17.2	21
<b>FOXP3gM 0</b>	3.9	3.8	0	20	3.2 ; 4.5	4
<b>FOXP2gM 1</b>	11.6	10.5	1	38	8.1 ; 15.1	17
<b>CD3sM 0</b>	21.9	14.5	1	90	19.6 ; 24.2	20
<b>CD3sM 1</b>	30.5	20	2	95	23.7 ; 37.2	32
<b>CD3gM 0</b>	21.1	14	3	92	18.9 ; 23.4	14
<b>CD3gM 1</b>	31.3	19.2	0	87	25 ; 37.8	28
<b>CD3/FOXP3 0</b>	7.8	56.4	0	57	6.5 ; 9	7
<b>CD3/FOXP3 1</b>	7.5	14.6	0	87	2.6 ; 12.4	8
<b>DFOXP3Ms_g0</b>	0.6	3.1	-10	11	0.8 ; 0.1	1
<b>DFOXP3Ms_g1</b>	1.6	4.4	-4	18	0.9;3	3
<b>DCD3Ms_g 0</b>	1.6	6.5	-17	26	0.6 ; 2.7	9
<b>DCD3Ms_g 1</b>	-0.9	2.7	-5	8	-1.8 ; -0.01	3

**Legende für Tab.7 s** geschätzte Spots, **g** gezählte Spots, **M** Mittelwert, **0** CLL, **1** PTLD

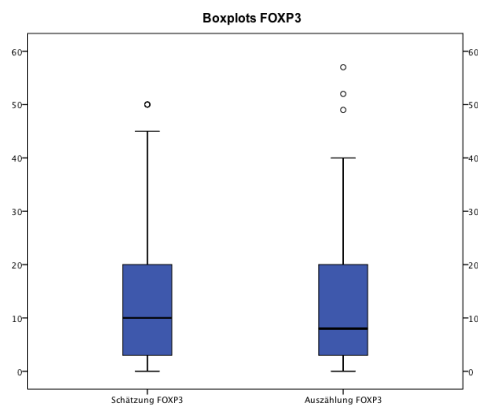
**Tab. 8 Zusammenfassung aller geschätzten und gezählten Resultate: Deskriptive Statistik: 32 Patienten ohne Patienten mit Medikamenten induzierten PTLD-ähnlichen Läsionen**

Färbung Code	Mittelwert	SD	Min	Max	95% VI	IQR
<b>sFOXP3</b>	14.5	14	0	50	12 ; 17	22
<b>gFOXP3</b>	13.1	13	0	57	10.9; 15.5	18
<b>sCD3</b>	30	20	0	90	26.4; 32.6	29
<b>gCD3</b>	29	21.4	1	95	24.8; 32.6	35
<b>DFOXP3s_g</b>	1.3	5.3	-17	37	0.4 ; 2.2	3
<b>DCD3s_g</b>	-1.5	4.6	-20	14	-2.3 ; -0.6	5

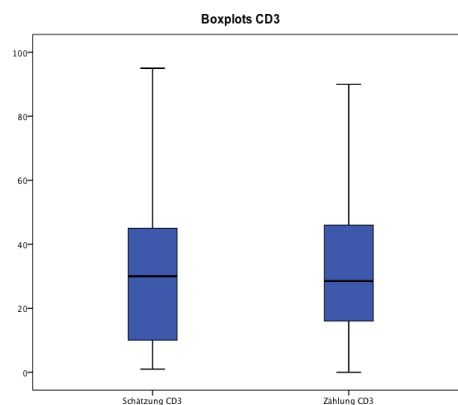
### 3.2.3 Vergleich von FOXP3 und CD3 in zwei untersuchten Krankheits-Gruppen (PTLD vs. CLL)

Zunächst haben wir FOXP3 bzw. CD3 für die PTLD-Gruppe alleine untersucht. Aus den Boxplots geht hervor, dass die Zählung und die Schätzung insgesamt keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied aufweisen (Abb. 13 a-d).

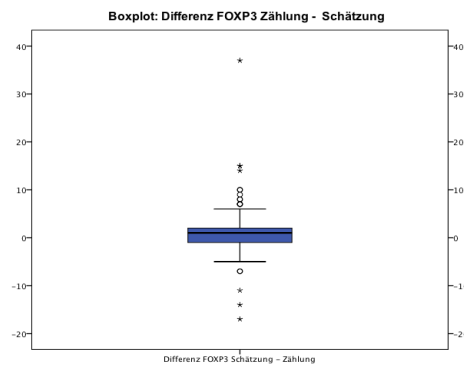
#### a. sFOXP3, gFOXP3



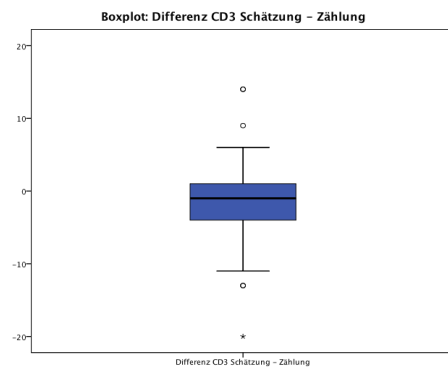
#### b. sCD3, gCD3



### c. Differenz FOXP3 s\_g



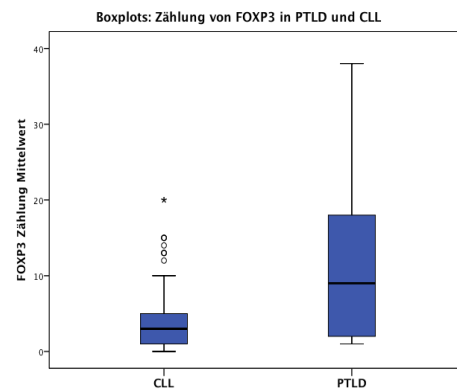
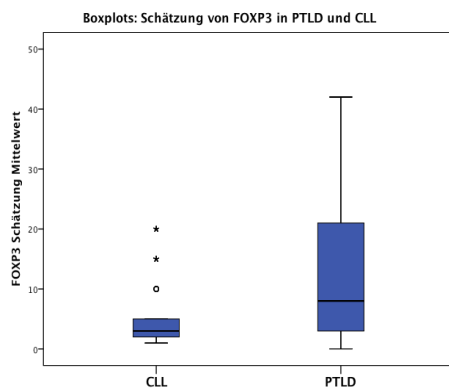
### d. Differenz CD3 s\_g



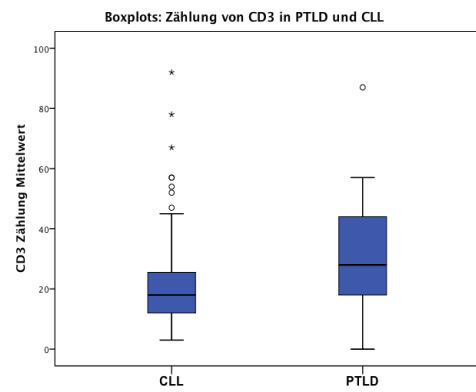
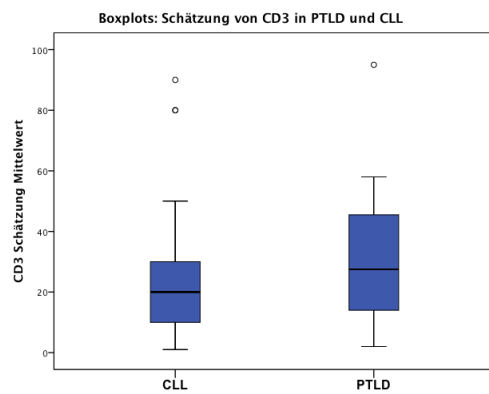
**Abb. 13: Boxplots: FOXP3 und CD3 in PTLD**

Anschließend haben wir die PTLD-Gruppe der CLL Kontrollgruppe gegenübergestellt. Aus den Boxplots geht hervor, dass wir bei der PTLD-Gruppe eindeutig höhere FOXP3 und CD3-Expressionen haben als bei der Kontrollgruppe mit CLL und zwar sowohl geschätzt wie auch gezählt (Abb. 14a und 14b). Die Ratio CD3/FOXP3 ist jedoch bei beiden Entitäten vergleichbar (Abb. 14c). Die Differenz zwischen Schätzung und Zählung bei FOXP3 und CD3 zeigt jedoch keine eindeutigen Werte (Abb. 14d).

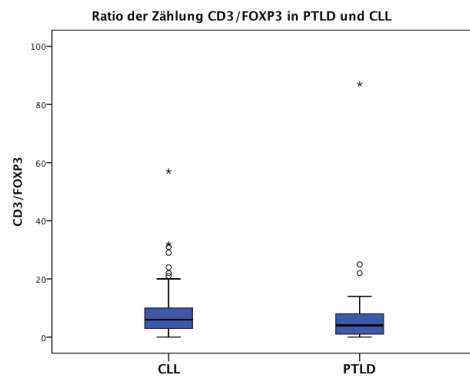
### a. sFOXP3 / gFOXP3 in CLL und PTLD



## b. sCD3 / gCD3 in CLL und PTLD



## c. Ratio CD3/FOXP3 bei CLL und PTLD



## d. Differenz FOXP3s\_g bei CLL und PTLD

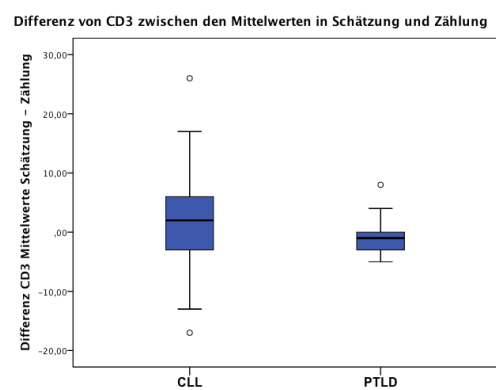
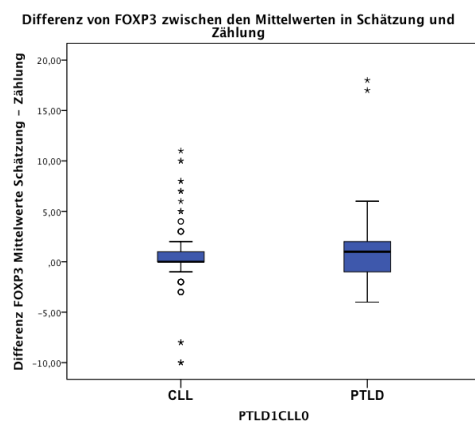


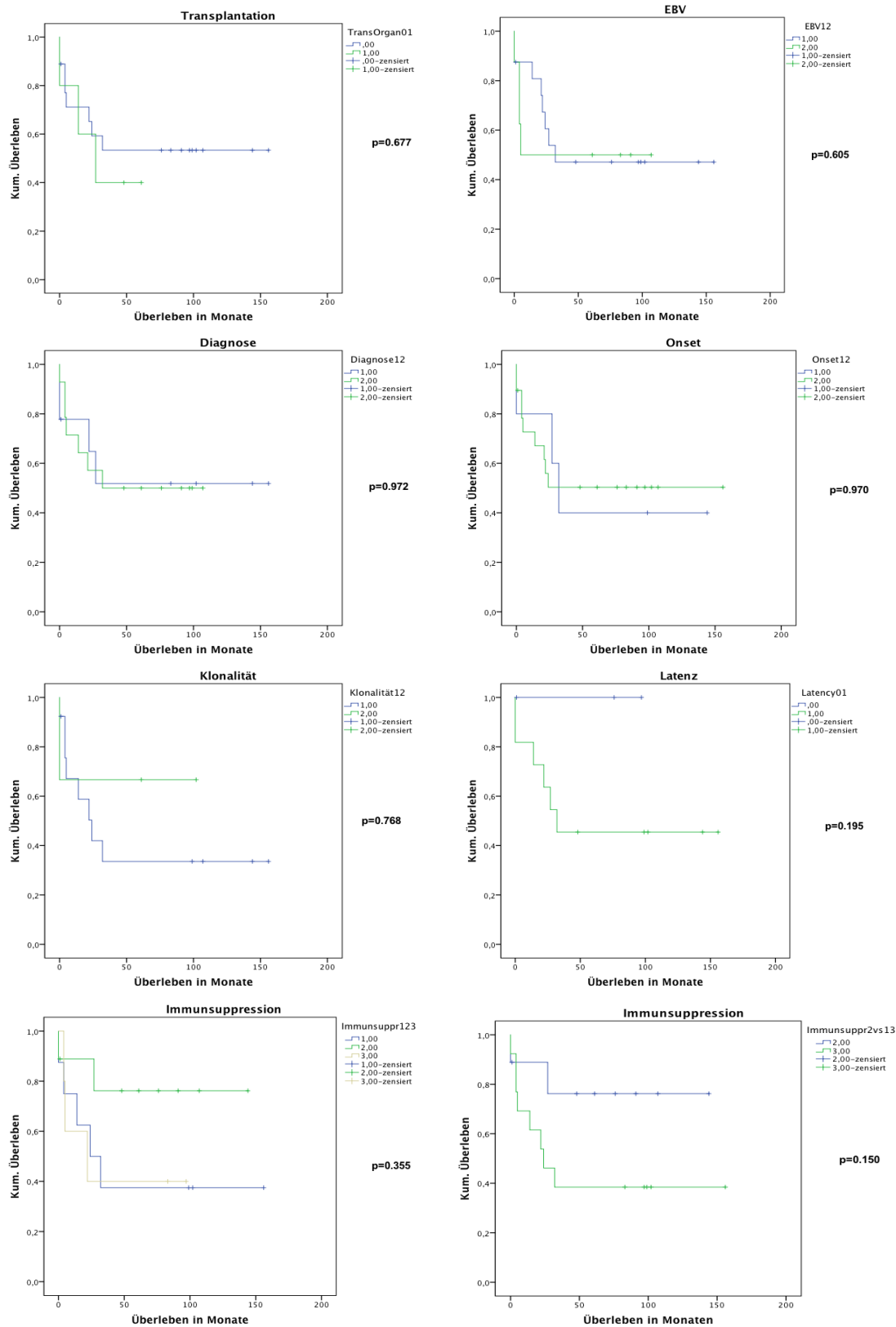
Abb. 14 Boxplots: FOXP3 und CD3 in PTLD und CLL

### 3.2.4 Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von verschiedenen Variablen, mit Angaben des p-Wertes

Im Folgenden haben wir Überlebens-Analysen für verschiedene Variablen durchgeführt, wie: Art des Transplantats, EBV-Status, Diagnose, Onset, Klonalität, Latenztyp und Immunsuppression. Keine der untersuchten Variablen zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Für die beiden letzten Diagramme welche das Überleben in Abhängigkeit von der Immunsuppression untersuchen, haben wir zwei verschiedene p-Werte erhalten. Im ersten Diagramm ( $p=0.355$ ) wurden die 3 verschiedenen Medikamenten-Gruppen einzeln analysiert, wobei die Azathioprin enthaltende Gruppe ein tendentiell längeres Überleben zeigt. Beim zweiten Diagramm ( $p=0.150$ ) wurden die erste (Azathioprin enthaltende Tripeltherapie) und dritte Gruppe (Tacrolimus enthaltende Tripeltherapie) zusammengefasst und der zweiten Gruppe (MMF enthaltende Tripeltherapie) gegenübergestellt (Tab. 9), wobei hier die MMF enthaltende Gruppe einen Trend zu längerem Überleben zu zeigen scheint (Abb. 15).

**Tab. 9 Erklärung der Abkürzungen in den Kaplan-Meier-Diagrammen**

Abkürzung	Bedeutung
<b>TransOrgan01</b>	0= singuläre SOT pro Patient 1= >2 unterschiedliche SOT pro Patient
<b>EBV12</b>	1= positiv 2= negativ
<b>Diagnose12</b>	1= polymorphes PTLD 2= monomorphes PTLD(NHL od cHL)
<b>Onset12</b>	1= early 2= late
<b>Klonalität12</b>	1= klonal 2= nicht-klonal
<b>Latenz01</b>	0= Grad I und II 1= Grad III und lytisch
<b>Immunsuppression123 bzw. 2vs13</b>	1= Azathioprin, CyclosporinA (CSA), Prednison, 2= Mofetil mycophenolate (MMF), CSA, Prednison 3= Tacrolimus, CSA, Prednison,



**Abb. 15 Überlebens-Analysen nach Kaplan-Meier**

### 3.2.5 Korrelation der untersuchten Variablen mit dem Überleben

Mit der Cox-Regression untersuchten wir die stetigen Variablen wie das Alter, die gezählten FOXP3- und die gezählten CD3-Werte. Einzig für das Alter ergab sich ein signifikanter Wert, was bedeutet, dass je älter die Patienten waren, desto niedriger war die Überlebenswahrscheinlichkeit (Tab. 10). Alle anderen Werte zeigten keine Signifikanz. Für einige Variablen führten wir weitere Untersuchungen durch. Der T-Test und ANOVA zeigten eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Überleben und der Immunsuppression. Das heisst bei denjenigen Patienten, welche im Mittel mehr CD3 positiven Zellen aufwiesen, beobachteten wir eine kleinere Überlebenswahrscheinlichkeit (Tab. 11).

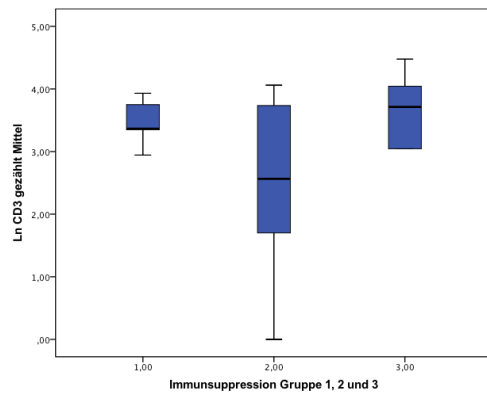
**Tab. 10 Cox-Regression**

	Cox-Regression p-Wert	HR	95% VI (HR)
<b>Alter</b>	<b>0.04</b>	1.05	1.002 ; 1.097
<b>LnFOXP3g_M</b>	0.37	1.32	0.720 ; 2.429
<b>LnCD3g_M</b>	0.35	0.803	0.509 ; 1.268
<b>LnCD3FOXP3</b>	0.25	0.696	0.368 ; 1.292

**Tab. 11 T-Test und ANOVA**

	p-Wert	
	LnFOXP3g_Mittel	LnCD3g_Mittel
<b>TransOrg01</b>	0.107	
<b>EBV12</b>	0.200	
<b>Latenz01</b>	0.218	
<b>Immunsuppression123</b>		<b>0.023</b>
<b>Immunsuppression2vs13</b>	0.464	<b>0.04</b>

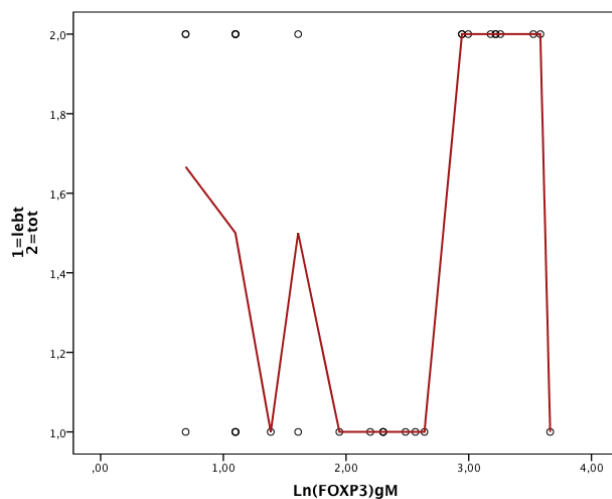




**Abb. 16 Boxplots CD3 in Abhängigkeit von den 3 Gruppen der Immunsuppression**

Bei Gruppe 1 (*Azathioprin* enthaltende Tripeltherapie) (n=15) und 3 (*Tacrolimus* enthaltende Tripeltherapie) (n=5) der Immunsuppression haben wir eine höhere Anzahl an CD3 mit kleiner Streubreite im Vergleich zur Gruppe 2 (*MMF* enthaltende Tripeltherapie) (n=11) mit tieferem CD3-Gehalt und grösserer Streubreite (Abb. 15).

Generell scheint, dass Patienten mit einer erhöhten Anzahl an FOXP3 eine kleinere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, als Patienten mit einer geringeren Anzahl an FOXP3 (Abb. 17). In dieser Untersuchung analysierten wir, ob es einen prozentualen Grenzwert gibt, der einen Einfluss auf das Überleben hat.



**Abb. 17 Abhängigkeit des prozentualen Anteils von FOXP3 auf das Überleben**

## 4 Diskussion

PTLD stellen eine heterogene Komplikation von Transplantationen dar, sowohl was die Art des Transplantates, das Auftreten, Diagnose, Verlauf und Therapie angeht. Obwohl unsere Anzahl der PTLD-Fälle mit 32 Patienten zu gering ist, um ausreichend statistisch signifikante Rückschlüsse zu ziehen, können wir mehrere Beobachtungen festhalten, die in der Literatur so noch nicht beschrieben sind.

Unser erstes Ziel bestand darin, die geeignete Auswertungsstrategie für die untersuchten immunhistochemischen Färbungen zu finden. Dabei zeigte sich, dass die computer-unterstützte Zählung und die Schätzung annähernd gleichwertig in ihrer Aussagekraft sind. Trotz der ähnlichen Werte, stützten wir uns bei den weiteren Analysen (Kaplan-Meier-Schätzung, Cox-Regression etc.) nur auf die Zählung da es bei den Schätzungen einige ausschweifende Werte (unter- und überschätzte) gab. Das benutzte Auswertungssystem (Instituts-intern entwickelter Spot-Viewer, Institut für klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich) empfehlen wir als hilfreiches Mittel für die Auswertung immunhistochemischer Marker, insbesondere bei solchen mit einer hohen Streubreite.

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen war die genaue Analyse der untersuchten Patientenkohorte. Unser Patientenkollektiv mit der Diagnose PTLD weist vergleichbare Veränderungen auf, welche bereits in der Literatur schon beschrieben wurden<sup>6 9 11 12 16 33</sup> und ist somit vergleichbar mit weiteren Studien. Die meisten PTLDs sind EBV-positiv und es konnte erwartungsgemäss ein Latenztyp III und IV beobachtet werden. Im Allgemeinen überwiegt der Late Onset-Anteil (Zeit von der Transplantation bis zur Diagnose >12 Monate bei 23 von 32 Patienten (72%), >60 Monate bei 14 von 32 Patienten (44%)).

In einem weiteren Schritt ging es darum, zu sehen, ob der Gehalt der untersuchten T-Zellpopulationen sich in unterschiedlichen B-Zell lymphoproliferativen Prozessen unterscheidet. Im Allgemeinen haben wir bei unserer Kontrollgruppe (CLL) weniger T-Zellen (sowohl gesamt CD3 T-Zellen als auch FOXP3 Tregs) geschätzt und gezählt.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die CLL-Gruppe im Vergleich zur PTLD-Gruppe eine homogenere, verdrängende Tumorphpopulation aufweist, welche annähernd den ganzen Spot einnimmt. Die zweite mögliche Erklärung ist, dass die Patienten in der PTLD-Gruppe zu 75% EBV-positiv waren (die CLL jedoch nach Definition negativ) und somit ein Gewebe aufwiesen, welches eine T-Zellaktivierung herbeigeführt hat und so auch die erhöhte Anzahl an Tregs erklären könnte. Ob die zur Vermeidung von Abstossungen eingesetzten immunsuppressiven Medikamente, welche zur Behandlung von CLL Patienten nicht zum Einsatz gelangen, zu diesem Unterschied führen, ist abschliessend nicht zu beurteilen.

Die zahlreichen untersuchten Variablen zeigten keine statistisch signifikanten Überlebensvorteile in Abhängigkeit von FOXP3 und CD3 bei den Patienten mit PTLD mit Ausnahme des Alters. Dies bedeutet, dass je älter die Patienten sind und je mehr FOXP3 bzw. CD3-positive Zellen sie aufwiesen, desto kleiner war die Überlebenswahrscheinlichkeit. Ein möglicher Grund für die wenigen statistisch signifikanten Ergebnisse kann ebenfalls an der geringen Anzahl eingeschlossener Patienten liegen. Interessant im Zusammenhang mit dem Überleben ist die Tatsache, dass wir fünf Patienten beobachten konnten, die bis zu fünfmal (zum Zeitpunkt des Abfassens der Doktorarbeit sogar sechsmal) rezidierten und mit 8.9 Jahren dennoch ein mittleres Überleben nach PTLD-Diagnosestellung aufwiesen, welche die mittlere Gesamtüberlebensrate (Zeitpunkt von PTLD Diagnose bis zum Tod bzw. bis zum letzten Follow up) von 4.4 Jahren deutlich überschreitet. Dies obwohl zwei dieser Patienten sogar einen ZNS-Befall aufwiesen, welche in der Literatur bis anhin mit einem schlechten Verlauf assoziiert sind.<sup>32</sup> Mit anderen Worten, Rezidive sprechen eher für ein stabiles Immunsystem und sind nicht zwingend mit einer erhöhten Mortalität gleichzusetzen. Bei der Untersuchung, ob die Art der verabreichten immunsuppressiven Therapie einen Einfluss auf die T-Zell Population hat, zeigen die Boxplots einen geringeren Anteil an CD3+ T-Lymphozyten in der Patientengruppe, welche eine Tripeltherapie mit *Mycophenolate mofetil* (MMF) erhielten. Dieser Unterschied im Vergleich mit den Gruppen, welche *Azathioprin* oder *Tacrolimus* in der Tripeltherapie enthielten (Immunsuppression123, LnCD3g\_M) erwies sich sowohl im T-Test wie bei der einfaktoriellen ANOVA Analyse als signifikant verschieden. Da wir weder eine Assoziation mit EBV, dem transplantierten Organ oder der Diagnose identifizieren konnten, gehen wir von der Hypothese aus, dass eine MMF enthaltende Tripeltherapie den stärksten globalen immunsuppressiven Effekt auf die T-Lymphozyten ausübt. Dies ist insofern eine interessante Hypothese, als dass eine Reduktion der Immunsuppression in der Regel den ersten Behandlungsschritt der EBV+ PTLD darstellt. Unsere Resultate könnten darauf hinweisen, dass die Dosierung von MMF als erstes reduziert und/oder als erstes der Medikamente weggelassen werden könnte.

Andersherum formuliert, könnte dies bedeuten, dass Gruppe 1 (*Azathioprin* enthaltende Tripeltherapie) und Gruppe 3 (*Tacrolimus* enthaltende Tripeltherapie) (Abb. 16) einen geringeren Einfluss auf die Suppression der CD3-positiven T-Lymphozyten haben.

Zusammenfassend zeigen unsere Erhebungen, dass mit grösster Wahrscheinlichkeit die Zusammensetzung der Tripeltherapie, nicht aber das Epstein-Barr Virus, oder das transplantierte Organ oder die Unterdiagnose eines PTLD die globale T-Zell-Antwort beeinflusst. Weiter konnten wir beobachten, dass selbst Patienten mit mehreren PTLD Rezidiven inklusive ZNS-Befall eine langjährige Überlebenschance aufweisen. Weitere Untersuchungen von zusätzlichen T-Zellsubpopulationen an grösseren Patientenkollektiven

dürften weitere Erkenntnisse zur Mikroumgebung der PTLD liefern. Ideale Voraussetzung dazu ist eine multidisziplinäre, prospektive Erfassung der Patienten mit PTLD an einem Zentrum mit Spezialisten inklusive Hämatopathologen.

## 5 Literaturverzeichnis

- 1 **O.M. Martinez, F.R. de Gruijl, et al.** *Molecular and Immunologic Mechanisms of Cancer Pathogenesis in Solid Organ Transplant Recipients.* AM J Transplant 2008;8:2205-2211
- 2 **Hanson MN, Morrison VA, Peterson BA et al.** *Posttransplant T-cell lymphoproliferative disorders - an aggressive, late complication of solid-organ transplan- tation.* Blood 1996;88:3626-3633.
- 3 **Swerdlow SH, Campo, E., Harris et al.** *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* In World Healtho Organization Classification of Tumours, Edition 4th Lyon: IARC 2008.
- 4 **Jung-Hye Choi, Byeong-Bae Par, Cheolwon Suh et al.** *Clinical Characteristics of Monomorphic Post-transplant Lymphoproliferative Disorders.* J Korean Med Sci 2010;25:523-526
- 5 **Kotton CN, Fishman JA.** *Viral infection in the renal transplant recipient.* J Am Soc Nephrol 2005;16:1758-1763
- 6 **Dharnidharka R et al.** *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders.* Springer Verlag, Kap.3, Berlin Heidelberg 2010
- 7 **Hiddemann et al.** *Lymphome: neue Erkenntnisse und Therapiestrategien.* Georg Thieme Verlag, Kap.16, Stuttgart/New York 2005
- 8 **Lim WH, Russ GR, Coates PT.** *Review of Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disorder post-solid organ trans-plantation.* Nephrology 2006;11:355-366
- 9 **Dharnidharka R et al.** *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders.* Springer Verlag, Kap.4, Berlin Heidelberg 2010
- 10 **Ghigna MR, Reineke T, Rincé P et al.** *Epstein-Barr Virus Infection and Altered Control of Apoptotic Pathways in Posttransplant Lymphoproliferative Disorders.* Pathobiology. 2012;80:53-59
- 11 **Dharnidharka R et al.** *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders.* Springer Verlag, Kap.6, Berlin Heidelberg 2010
- 12 **Kingston H. G. Mills** *Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection?* Nature Reviews 2004;10.1038/nril485
- 13 **Geoff Y.Zhang, Min Hu, Yuan Min Wang et al.** *Foxp3 as a marker of tolerance induction versus rejection.* Curr Opin Organ Transplant 2009 ;14:40-45

- 14 **Wigate PJ, McAulay KA, Anthony IC et al.** *Regulatory T cell activity in primary and persistent Epstein-Barr virus infection.* J Med Virol. 2009;81 :870-877
- 15 **Kendal AR, Chen Y, Regateiro FS et al.** *Sustained suppression by Foxp3 regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance.* J Exp Med 2011;208:2043-2053
- 16 **Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF et al.** *Foxp3 regulatory T cells: From suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance.* Transpl Immunol 2012 ;26 :1-10
- 17 **Wieczorek G, Asemissen A, Model F et al.** *Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue.* Cancer Res. 2009;69 :599-608
- 18 **A. Corthay.** *How do Regulatory T Cells Work?* Sc J of Immunol 2009;70:326-336
- 19 **Kim JM, Rudensky A.** *The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells.* Immunol Rev 2006;212:86-98
- 20 **Josefowicz SZ, Rudensky A.** *Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance.* Immunity 2009;30:616-625
- 21 **Kryczek I, Liu R, Wang G et al.** *FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease.* Cancer Res 2009;69:3995-4000
- 22 **Hampras SS, Nesline M, Wallace PK et al.** *Predictors of Immunosuppressive Regulatory T Lymphocytes in Healthy Women.* J Cancer Epidemiol 2012;1910-1990
- 23 **Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD.** *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.* Curr Opin Rheumatol 2003;15:430-435
- 24 **Betts G, Jones E, Junaid S et al.** *Suppression of tumour-specific CD4<sup>+</sup> T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer.* Gut 2012;61:1163-1171
- 25 **Varma S, Varma N, Sachdeva MU et al.** *Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Their role in disease progression and autoimmune cytopenias.* Leuk Lymphoma 2012-10-16
- 26 **Piper KP, Karanth M, McLarnon A.** *Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4<sup>+</sup> T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4<sup>+</sup> forkhead box P3<sup>+</sup> T cells.* Clin Exp Immunol 2011;166 :154-163

- 27 **Kim MJ, Yun SH, Chun HK et al.** *Post-transplant lymphoproliferative disorder localized in the colon after liver transplantation: report of a case.* Surg today 2009;39:1076-1079
- 28 **Jena M. Giltane et al.** *Identification of biomarkers with tissue microarray technology.* Nature Clinical Practice Oncology. 2004;1:104-111
- 29 **Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G.** *Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research.* Int J Cancer. 2001;94:1-5.
- 30 **Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al.** *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints.* Am J Pathol. 2001;159:2249-2256
- 31 **Welsch U, Sobotta J.** *Lehrbuch Histologie*, Urban&Fisher Verlag, 2.Auflage, Kap. 1, München 2005
- 32 **Phan TG, O'Neill BP, Kurtin PJ.** *Posttransplant primary CNS lymphoma.* Neuro Oncol. 2009;2:229-238

## 6 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle in chronologischer Reihenfolge bei vielen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit sehr unterstützt haben.

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. H. Moch richten, der uns als Institutsdirektor die Infrastruktur des Institutes für klinische Pathologie zur Verfügung stellte und uns diese Studie dank der Bereitstellung von zahlreichen, exzellenten und motivierten Mitarbeitern erst ermöglichte.

Mein größter Dank gilt Frau PD Dr. med. M. Tinguely (Institut für Klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich und Kempf&Pfaltz, Histologische Diagnostik, Zürich), die mich während meiner ganzen Promotionsphase begleitet hatte. Sie stand mir immer mit Rat und Tat bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen zu Seite und verstand es mich in den richtigen Momenten zu motivieren;

Frau Dr. med. T. Reineke für die Einführung ins Thema und für die zahlreichen geleisteten Vorarbeiten (Institut für Klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich, Institut für Pathologie Medizinische Hochschule Hannover);

Frau M. Storz, Biobank des Institutes für klinische Pathologie für die Erstellung der Tissue microarrays;

Das Team des Labors für in situ Techniken für die zahlreich durchgeführten immunhistochemischen Färbungen.

Frau M. Bieri und Herrn A. Wethmar aus dem Team von Herrn N. Wey, Abteilung Mediasupport, Institut für klinische Pathologie für das Einscannen der Tissue microarrays und die grossartige Entwicklung des Spot-Viewers, womit ich die Spots auch von zu Hause aus auszählen konnte;

Frau Dr. M. Roos (Abteilung für Biostatistik des Instituts für Sozial- und Präventivmedizin) für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Resultate;



Herrn Prof. Dr. T. Fehr (Nephrologie, UniversitätsSpital Zürich) und Frau Prof. Dr. A. Boehler (Pneumologie, UniversitätsSpital Zürich) für die Bereitstellung der klinischen Daten;

Herrn T. Bischof für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren;

Insbesondere möchte ich meinen Eltern und Bekim, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist, danken. Sie haben mir diese Universitätsausbildung ermöglicht, mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite gestanden und mich nicht zuletzt fortlaufend ermuntert, diese Doktorarbeit fertig zu stellen.